

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**Insecticidal cotton plant cells.**

Patent Number: EP0317511

Publication

date: 1989-05-24

Inventor(s): DE FRAMOND ANNICK; RAJASEKARAN KANNIAH; CAROZZI NADINE; RICE DOUGLAS; ANDERSON DAVID M; LOTSTEIN RICHARD; RANGAN THIRUMALE S; YENOFKY RICHARD

Applicant(s): CIBA GEIGY AG (CH)

Requested

Patent: ☐ EP0317511, A3

Application

Number: EP19880810767 19881109

Priority Number

(s): US19870122109 19871118

IPC

Classification: A01H1/00; A01N65/00; C12N5/00; C12N15/00

EC

Classification: A01H1/00, C12N15/82C8B6E, C07K14/325, C12N9/88

Equivalents: AU2568188, AU616444, BR8806021, ☐ JP1160480, RU2024613, ZA8808598

Cited


Documents: EP0142924; EP0289479; EP0270355; EP0193259; EP0238441; WO8905344

---

**Abstract**

---

The invention relates to a chimeric gene which, in the cells of cotton plants, expresses insecticidal compounds which essentially have the insect-toxic properties of the crystalline protein produced by *Bacillus thuringiensis*. The transformed cells are regenerated to complete plants which are toxic to the larvae of

insects from the orders Lepidoptera, Coleoptera and Diptera. 

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2

12

# **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

21 Anmeldenummer: **88810767.9**

51 Int. Cl.<sup>4</sup>: **C 12 N 5/00**  
**A 01 H 1/00, C 12 N 15/00,**  
**A 01 N 65/00**

22 Anmeldetag: **09.11.88**

30 Priorität: **18.11.87 US 122109**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**24.05.89 Patentblatt 89/21**

64 Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

71 Anmelder: **CIBA-GEIGY AG**  
**Klybeckstrasse 141**  
**CH-4002 Basel (CH)**

72 Erfinder: **Rice, Douglas**  
**137 Pinecrest Road**  
**Durham North Carolina 27705 (US)**

**Carozzi, Nadine**  
**Route 6, Box 348P**  
**Raleigh North Carolina 27612 (US)**

**Lotstein, Richard**  
**1619 Delaware Street**  
**Durham North Carolina 27705 (US)**

**de Framond, Annick**  
**2422 West Club Blvd.**  
**Durham North Carolina 27705 (US)**

**Anderson, David M.**  
**1366 E. Skywood Circle**  
**Altadena California 91001 (US)**

**Rajasekaran, Kanniah**  
**116C Esperanza Avenue**  
**Sierra Madre California 91024 (US)**

**Rangan, Thirumale S.**  
**2330 E. Del Mar Bl No. 201**  
**Pasadena California 91107 (US)**

**Yenofsky, Richard**  
**628 W. Norman Avenue**  
**Arcadia California 91006 (US)**

Der Anmelder hat eine Erklärung nach Regel 28 (4) EPÜ (Herausgabe einer Probe nur an einen Sachverständigen) eingereicht. Eingangsnummer(n) der Hinterlegung(en): ATCC 67329, ATCC 67330, ATCC 40235, ATCC 40486, ATCC 40487.

54 Insektizide Baumwollpflanzenzellen.

57 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein chimäres Gen, das in den Zellen von Baumwollpflanzen insektizid wirksame Verbindungen exprimiert, die im wesentlichen die Insekten-toxischen Eigenschaften des von *Bacillus thuringiensis* produzierten kristallinen Proteins besitzen.

Die transformierten Zellen werden zu kompletten Pflanzen regeneriert, die toxisch sind gegenüber Insektenlarven aus den Ordnungen *Lepidoptera*, *Coleoptera* und *Diptera*.

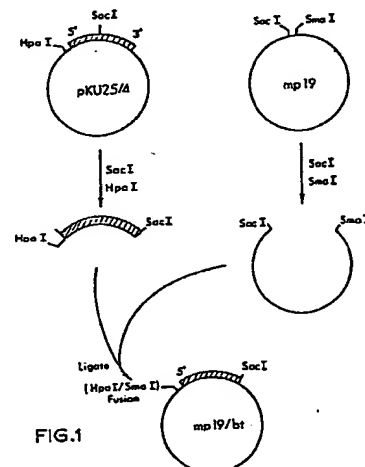


FIG.1

## Beschreibung

## Insektizide Baumwollpflanzenzellen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein chimäres Gen, das in den Zellen von Baumwollpflanzen insektizid wirksame Verbindungen exprimiert, die im wesentlichen die Insekten-toxischen Eigenschaften des von *Bacillus thuringiensis* produzierten kristallinen Proteins besitzen.

*B. thuringiensis* (im Folgenden mit *Bt* bezeichnet) ist eine Bakterien-Spezies, die ein kristallines Protein produziert, das auch als  $\delta$ -Endotoxin bezeichnet wird. Technisch gesehen handelt es sich bei diesem kristallinen Protein um ein Protoxin, das in ein Toxin umgewandelt wird, wenn es den Verdauungstrakt von *Lepidoptera*-, *Coleoptera*- und *Diptera*-Larven (Insekten) passiert.

Das kristalline Protein von *Bt* ist ein potentiell wichtiges Insektizid, das, soweit bekannt, keine schädlichen Auswirkungen auf Menschen, andere Säugetiere, Vögel, Fische oder auf Insekten, - mit Ausnahme der Larven von Lepidopteren, Coleopteren und Dipteren -, hat. Die Aktivität des *Bt* Toxins ist ausserordentlich hoch, sodass bereits wenige Nanogramm dieser Substanz ausreichen, um empfindliche Insektenlarven abzutöten. Weitere Vorteile, die für eine Verwendung des kristallinen Proteins von *Bt* als Insektizid sprechen, sind dessen breites Aktivitätsspektrum gegen *Lepidoptera*-, *Diptera*- und *Coleoptera*-Larven sowie die offensichtliche Schwierigkeit für diese Larven, Resistenzen gegen das kristalline Protein zu entwickeln. Dies trifft auch dort zu, wo das kristalline Protein in grossem Massstab eingesetzt wird.

Die zuvor erwähnten Insektenlarven stellen ein schwerwiegendes Problem für die Land- und Forstwirtschaft dar, insbesondere was die Kultivierung von Baumwolle betrifft.

Das kristalline Protein entwickelt seine insektizide Wirksamkeit, wenn es auf Pflanzen appliziert wird, die mit Lepidopteren-, Coleopteren- oder Dipterenlarven befallen sind. Zu diesen Pflanzen gehören beispielsweise Brokkoli, Salat und Baumwolle. In Baumwollkulturen stellt insbesondere der Befall mit Lepidopterenlarven ein besonders schwerwiegendes Problem dar.

Bisher wurde das *Bt* Kristallprotein (Protoxin) direkt aus dem Bakterium isoliert und mit Hilfe von Standardmethoden, wie Bestäuben oder Besprühen, auf die Pflanzen appliziert.

Präparate, die das *Bt* Kristallprotein enthalten, werden kommerziell als biologische Insektizide vertrieben.

Als Beispiele seien aufgeführt:

Bactospeine, vertrieben durch Blochem Products Ltd.; Dipel, vertrieben durch Abbot Laboratories; und Thuricide, vertrieben durch Sandoz AG.

Die Tatsache, dass *Bt* das Kristallprotein nur während der Sporulationsphase produziert, stellt einen schwerwiegenden Nachteil dar, was die industrielle Herstellung und Verwendung dieses biologischen Insektizids betrifft.

Im Verlaufe eines industriellen Fertigungsprozesses können solche in Zusammenhang mit einer bestimmten Wachstumsphase stehenden Beschränkungen zu Schwierigkeiten und Zeitverzögerungen während der Herstellung führen.

Hinzu kommt, dass es die bei einem solch komplexen Herstellungsverfahren anfallenden Kosten für ein biologisches Insektizid schwierig machen, mit anderen wirksamen und kommerziell erhältlichen Produkten, die auf definierten chemischen Verbindungen basieren, wie z.B. die Pyrethroid-Derivate, zu konkurrieren.

Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung des *Bt* Toxins ist beispielsweise durch die Tatsache gegeben, dass das Protoxin auf der Oberfläche der behandelten Pflanzen verbleibt, wo es nur gegen an der Oberfläche fressende Larven wirkt und wo es durch anhaltende ultraviolette Bestrahlung inaktiviert wird. Diese Inaktivierung dürfte wenigstens eine der Ursachen für die generell fehlende Persistenz des kristallinen Proteins in der Umwelt sein. Dementsprechend ist eine häufige und kostspielige Applikation des kristallinen Proteins notwendig.

Diese und andere Nachteile können dadurch überwunden werden, dass man ein Gen, welches ein *Bt* Kristallprotein oder aber ein Protein kodiert, das im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften des *Bt* Kristallproteins aufweist, in Pflanzen einschleust und dort exprimiert.

Die zuvor genannten Nachteile können gemäss der vorliegenden Erfindung dadurch überwunden werden, dass man ein Gen, welches ein *Bt* Kristallprotein oder aber ein Protein kodiert, das im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften des *Bt* Kristallproteins aufweist, in Baumwollpflanzen einschleust, dort exprimiert und anschliessend aus den transformierten Protoplasten fertile transgene Baumwollpflanzen regeneriert und diese Insekten-resistenten Baumwollpflanzen kultiviert.

Mit den Verfahren der rekombinanten DNA-Technologie ist es möglich, ein Gen, das für die Produktion eines nützlichen Polypeptids verantwortlich ist, von einer Donorzelle, in welcher das Gen natürlicherweise vorkommt, in eine Empfängerzelle zu transferieren, in welcher das Gen natürlicherweise nicht vorkommt (US Patente 4,237,224 und 4,468,464). Es gibt tatsächlich nur wenige inhärente Grenzen für solche Genübertragungen. So können Gene beispielsweise zwischen Viren, Bakterien, Pflanzen und Tieren übertragen werden. In einigen Fällen ist das transferierte Gen in der Empfängerzelle funktionstüchtig oder kann funktionstüchtig gemacht werden. Wenn die Empfängerzelle eine Pflanzenzelle ist, können ganze Pflanzen aus der Zelle regeneriert werden.

Gene bestehen typischerweise aus DNA-Sequenzabschnitten, die einen Promotor und einen transkribierten Abschnitt enthalten. Der transkribierte Abschnitt enthält normalerweise eine 5'-nichttranslatierte Region, eine kodierende Sequenz und eine 3'-nichttranslatierte Region.

Der Promotor enthält die DNA-Sequenz, die zur Initiation der Transkription notwendig ist, in deren Verlauf die transkribierte Region in mRNA übersetzt wird. Man nimmt an, dass der Promotor in eukaryotischen Zellen einen Abschnitt enthält, der von der RNA-Polymerase erkannt wird, sowie einen weiteren Abschnitt, der die RNA-Polymerase an die für die Initiation der Transkription geeignete Stelle auf der DNA dirigiert. Dieser letztere Abschnitt wird als die TATA-Box bezeichnet. Die TATA-Box befindet sich gewöhnlicherweise etwa 30 Nukleotide stromaufwärts ('up-stream') der Transkriptionsinitiationsstelle.

An den Promotorabschnitt schliesst sich eine Sequenz an, die in mRNA transkribiert, aber nicht in ein Polypeptid translatiert wird. Diese Sequenz stellt die sogenannte 5'-nichttranslatierte Region dar, und man nimmt an, dass sie Sequenzen enthält, die für die Initiation der Translation verantwortlich sind, wie z.B. eine Ribosomenbindungsstelle.

Als kodierenden Abschnitt bezeichnet man diejenige Sequenz, die sich unmittelbar stromabwärts ('downstream') der 5'-nichttranslatierten Region in der DNA oder der entsprechenden RNA befindet. Der kodierende Abschnitt wird entsprechend dem genetischen Kode in Polypeptide translatiert. Beispielsweise besitzt *Bt* ein Gen mit einer kodierenden Sequenz, die in die Aminosäuresequenz des insektiziden kristallinen Proteins translatiert wird.

Dem kodierenden Abschnitt folgt stromabwärts eine Sequenz, von der zwar mRNA transkribiert, aber kein Polypeptid translatiert wird. Diese Sequenz wird die 3'-nichttranslatierte Region genannt, und man nimmt an, dass sie ein Signal enthält, das zur Termination der Transkription führt. In eukaryotischer mRNA liegt in diesem Bereich ein weiteres Signal vor, das die Polyadenylierung des transkribierten mRNA-Strangs bewirkt. Es wird angenommen, dass die Polyadenylierung der mRNA Processing- und Transportfunktionen erfüllt.

Natürliche Gene können als eine Einheit von einer Donorzelle auf eine Empfängerzelle übertragen werden. Es ist jedoch oft vorteilhaft, ein Gen zu konstruieren, das die gewünschte kodierende Region sowie einen Promotor und gegebenenfalls 5'- und 3'-nichttranslatierte Abschnitte enthält, wobei der Promotor sowie die 5'- und 3'-nichttranslatierten Regionen natürlicherweise nicht im selben Gen vorkommen wie der kodierende Abschnitt. Solche Konstrukte werden als chimäre Gene bezeichnet.

Es sind bereits gentechnologische Verfahren beschrieben worden, die zu einer Verbesserung bei der Herstellung kristalliner Proteine geführt haben. Beispielsweise werden in den US Patenten 4,448,885 und 4,467,036 Plasmide beschrieben, die für die Herstellung des kristallinen Proteins in anderen Bakterienstämmen als *Bt* geeignet sind. Diese Verfahren erlauben zwar die Herstellung des kristallinen Proteins, sie beseitigen aber nicht die Nachteile, die bei der kommerziellen Verwendung des kristallinen Proteins als Insektizid auftreten.

Es wurden mittlerweile auch Vorschläge gemacht, *Bt* Toxingene direkt in Pflanzen zu klonieren, um den Pflanzen dadurch die Möglichkeit zu geben, sich selbst zu schützen (Klausner, 1984). In der Europäischen Patentanmeldung 142,924 (Agrigenetics) wird ein Verfahren zur Klonierung von *Bt* Toxingenen in Tabak beschrieben (Seite 59) und vorgeschlagen, Baumwolle auf die gleiche Weise zu schützen (Seite 77).

Dieser Vorschlag muss jedoch als rein spekulativ angesehen werden, solange keine Verfahren zur Transformation von Baumwollzellen sowie zur Regeneration ganzer Pflanzen aus diesen Zellen zur Verfügung stehen.

Solche Verfahren sind in der US-Patentanmeldung Nr. 122,200 der Firma Phytogen mit dem Titel "Regeneration und Transformation of Cotton" sowie der US-Patentanmeldung Nr. 122,162 der Firma CIBA GEIGY Corp. mit dem Titel "An Efficient Method for Regenerating Cotton from Cultured Cells" beschrieben.

Diese beiden Patentanmeldungen wurden am gleichen Tag hinterlegt wie die vorliegende Anmeldung.

Die Transformationsverfahren aus der Phytogen US-Patentanmeldung Nr. 122,200 sowie die Verfahren zur Regeneration von Baumwollpflanzen in den Phytogen bzw. CIBA-GEIGY US-Patentanmeldungen Nr. 122,200 bzw. Nr. 122,162 sind integrale Bestandteile der vorliegenden Anmeldung.

Es muss daher als eine vordringliche Aufgabe angesehen werden, neue Verfahren für die Herstellung eines *Bt* Kristallproteins oder eines vergleichbaren Proteins, das im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften (insektizide Aktivität) des *Bt* Kristallproteins aufweist, in Zellen von Baumwollpflanzen zu entwickeln sowie von Verfahren zur Kontrolle von Insektenlarven, die sich von besagten Baumwollpflanzen ernähren. Unter "Kontrolle" soll im Rahmen dieser Erfindung die Abtötung der Larven oder aber zumindest eine substantielle Reduktion der Nahrungsaufnahme verstanden werden.

Eine weitere vordringliche Aufgabe besteht in der Bereitstellung von Verfahren zum Schutz von Baumwollpflanzen vor Schäden, die durch Schädlinge oder Pathogene verursacht werden. Diese Verfahren beruhen auf der Herstellung eines pestizid wirksamen oder antipathogenen Proteins in der pflanzlichen Zelle, respektive der ganzen Pflanze und zwar in einer Konzentration, die ausreicht, um den Schädling oder das Pathogen effektiv abzutöten oder unter Kontrolle zu halten.

Insbesondere besteht die Aufgabe zur Bereitstellung eines Verfahrens zum Schutz von Baumwollpflanzen gegen Schäden, die von Insekten verursacht werden. Es handelt sich dabei um ein Verfahren, das auf der Herstellung eines *Bt* Kristallproteins oder eines vergleichbaren Proteins, das im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften des *Bt* Kristallproteins aufweist, in der pflanzlichen Zelle beruht und zwar in einer Konzentration, die ausreicht, diejenigen Schadinsekten, die sich von diesen Pflanzen ernähren, abzutöten oder aber zumindest unter Kontrolle zu halten.

Eine weitere Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zum Schutz von Baumwollpflanzen vor negativen Einflüssen durch chemische Agentien, wie z.B. Erhöhung der Tolerabilität in bezug auf bestimmte Herbizide, damit diese in Zukunft in Baumwollkulturen breitere Anwendung finden können, mit minimalen

Nebenwirkungen für das Ökosystem.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher in erster Linie transgene Baumwollzellen, die ein chimäres Gen stabil in das Pflanzengenom integriert enthalten, das zur Expression eines Polypeptides führt, welches im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften des *Bt* Kristallproteins aufweist.

5 Ebenso von der vorliegenden Erfindung umfasst sind transgene Baumwollpflanzen, die aus transgenen Baumwollzellen (Protoplasten) regeneriert werden können und die besagtes chimäres Gen stabil in ihr Genom eingebaut enthalten, das die Pflanze im Zuge der Genexpression unattraktiv und/oder toxisch macht für Insektenlarven, wodurch diese vor Insektenfrass geschützt sind.

10 Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung betrifft das Vermehrungsgut und die Nachkommenschaft besagter transgener Baumwollpflanzen.

Unter Vermehrungsgut transgener Baumwollpflanzen soll im Rahmen dieser Erfindung jedes beliebige pflanzliche Material verstanden werden, das sich auf sexuellem oder asexuellem Wege bzw. *in-vivo* oder *in-vitro* vermehren lässt. Als besonders bevorzugt sind im Rahmen dieser Erfindung in erster Linie Protoplasten, Zellen, Kalli, Gewebe, Organe, Samen, Embryonen, Pollen, Eizellen, Zygoten anzusehen sowie  
15 jedes beliebige andere Vermehrungsgut, das von transgenen Baumwollpflanzen erhalten werden kann. Ebenso umfasst von der vorliegenden Erfindung ist die Nachkommenschaft besagter transformierter Baumwollzellen oder -pflanzen. Diese umfasst auch Mutanten und Varianten, die mit Hilfe bekannter Verfahren, wie beispielsweise durch Zellfusionen oder Mutantenselektion, gewonnen werden können und die noch die charakteristischen Eigenschaften des Ausgangsmaterials aufweisen, welche diese aufgrund der  
20 Transformation mit exogener DNA erhalten hat.

Wie aus der nachfolgenden detaillierten Beschreibung der Erfindung ersichtlich wird, konnten diese und andere Aufgaben der vorliegenden Erfindung überraschenderweise durch die Bereitstellung von chimären Genen, die in der Lage sind, in Baumwollzellen ein Polypeptid zu exprimieren, welches im wesentlichen die Insektentoxizität des *Bt* Kristallproteins (von nun an chimäres *Bt* Toxingen genannt) aufweist, gelöst werden.

25 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft daher in erster Linie ein Verfahren zur Herstellung eines Toxins in den Zellen von Baumwollpflanzen, das im wesentlichen die Insektentoxizität des kristallinen Proteins von *Bt* aufweist. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren zur

a) Rückgewinnung der Zellen sowie von jeglichem embryogenen Kallus aus dem Kallus-Wachstumsmedium;

30 b) Resuspendierung der Zellen und des embryogenen Kallus in einem Kallus-Wachstumsmedium, das einen *Agrobacterium*-Vektor enthält, der ein Gen besitzt, welches Baumwollzellen eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin verleiht, wobei die Bedingungen für ein Wachstum in der Suspension für einen Zeitraum aufrechterhalten werden, der für die Transformation der suspendierten Zellen ausreicht;

35 c) Rückgewinnung der suspendierten Zellen aus dem *Agrobacterium*-haltigen Kallus-Wachstumsmedium;

d) Behandlung der transformierten Zellen und des embryogenen Kallus mit einem Antibiotikum in einer Konzentration, die ausreicht, die *Agrobakterien* abzutöten;

40 e) in Kontakt bringen der Zellen und des embryogenen Kallus mit dem Antibiotikum Hygromycin zur Selektionierung der transformierten Zellen und des transformierten embryogenen Kallus;

f) Filtrieren der Suspension zur Entfernung von embryogenem Kallus, der eine Grösse von ca. 600 Micron ( $\mu\text{m}$ ) überschreitet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Abtötung oder zur Kontrolle von Insektenlarven, die sich von Baumwollpflanzenzellen ernähren, die chimäre Gene enthalten, welche eine  
45 insektizide Menge eines Toxins exprimieren, das im wesentlichen die Insektentoxizität des kristallinen Proteins von *Bt* aufweist. Unter insektiziden Baumwollpflanzenzellen sind erfindungsgemäss solche von ganzen Pflanzen sowie von Teilen von Pflanzen zu verstehen sowie einzelne Baumwollzellen in Kultur.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung betrifft ein Verfahren zum Schutz von Baumwollpflanzen vor Insektenfrass, das sich dadurch kennzeichnet, dass man innerhalb der die Pflanze aufbauenden  
50 Pflanzenzellen ein *Bt* Kristallprotein oder aber ein Protein, das im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften des *Bt* Kristallproteins besitzt, in einer Menge exprimiert, die ausreicht, die Insektenlarven abzutöten oder aber zumindest diese unter Kontrolle zu halten.

Besonders bevorzugt ist ein Verfahren zum Schutz von Baumwollpflanzen vor Schäden, die durch Lepidopterenlarven verursacht werden.

55 Ebenfalls umfasst von der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren, das es erlaubt, das *Bt* Kristallprotein oder aber ein Protein, das im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften des *Bt* Kristallproteins besitzt, in einer Menge zu produzieren, die ausreicht, die Pflanze unattraktiv und/oder toxisch zu machen für Insektenlarven, wodurch diese vor Insektenfrass geschützt ist.

60 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Bereitstellung von Genen und anderen DNA-Segmenten sowie von Zellen und Pflanzen, die mit den zuvor näher bezeichneten Verfahren in Zusammenhang stehen.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung umfassen das chimäre *Bt* Toxingen in Vektoren, Bakterien, Pflanzenzellen in Kultur und als Bestandteil lebender Pflanzen sowie Verfahren für die Herstellung eines Toxins, das im wesentlichen die Insektentoxizität des *Bt* Kristallproteins aufweist, in Baumwollzellen  
65 sowie Verfahren zum Schutz von Baumwollpflanzen vor Schäden, die durch Insekten verursacht werden, die

auf der Herstellung in der pflanzlichen Zelle eines *Bt* Kristallproteins oder eines vergleichbaren Proteins, das im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften des *Bt* Kristallproteins aufweist, basiert.

#### Abbildungen:

- Fig. 1: Konstruktion von mp 19/bt, einem Plasmid, welches das 5'-Ende des *Bt* Protoxingens enthält. 5
- Fig. 2: Konstruktion von mp 19/bt ca/del, einem Plasmid, welches den Promotor des CaMV Gens VI in Verknüpfung mit dem 5' Ende der *Bt* Protoxin-kodierenden Region enthält.
- Fig. 3: Konstruktion von p7O2/bt, einem Plasmid, welches die 3'-kodierende Region des Protoxins in Verknüpfung mit den Transkriptions/Terminationssignalen von CaMV enthält. 10
- Fig. 4: Konstruktion von pBR322/bt 14, welches die komplette kodierende Region des Protoxins enthält, flankiert von den CaMV Promotor-und Terminatorsequenzen.
- Fig. 5: Konstruktion von pRK252/Tn903/BglII.
- Fig. 6: Konstruktion von pCIB5.
- Fig. 7/8: Konstruktion von pCIB4. 15
- Fig. 9: Konstruktion von pCIB2.
- Fig. 10: Konstruktion von pCIB10, einem Plasmid mit breitem Wirtsspektrum, das die T-DNA Grenzsequenzen sowie ein Gen zur Selektion transformierter Pflanzen enthält.
- Fig. 11: Konstruktion von pCIB10/19Sbt.
- Fig. 12: Konstruktion von pCIB710. 20
- Fig. 13: Konstruktion von pCIB10/710.
- Fig. 14: Konstruktion von pCIB10/35Sbt.
- Fig. 15: Konstruktion von pCIB10/35Sbt(KpnI).
- Fig. 16: Konstruktion von pCIB10/35Sbt(BclI).
- Fig. 17: Konstruktion von pCIB10/35Sbt(607). 25
- Fig. 18: nicht existent.
- Fig. 19: Konstruktion von pCIB1300, einem Plasmid, das ein chimäres Gen mit dem 35S CaMV Promotor, dem CaMV-Leader, der *Bt*(Bc1)Deletion und dem 35S Terminator enthält.
- Fig. 20, 21 und 22: Konstruktion von pCIB1301, einem Plasmid, das ein chimäres Gen mit dem rbc-gX Promotor aus Baumwolle und der *Bt*-Toxin (607 Deletion) kodierenden Sequenz enthält. 30
- Fig. 23: Konstruktion von pCIB1302, einem Plasmid, das ein chimäres Gen mit dem rbc-gY Promotor aus Baumwolle und der *Bt*-Toxin (607 Deletion) kodierenden Sequenz enthält.
- Fig. 24: Restriktionskarte der rbc-gX und rbc-gY enthaltenden Baumwoll-Klone
- Fig. 25: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von rbc-gY. Das erste ATG und Methionin des Transitpeptides sind in der Abbildung eingerahmt. 35
- Fig. 26: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von rbc-gX. Das erste ATG und Methionin des Transitpeptides sind in der Abbildung eingerahmt.

#### Hinterlegung:

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wurden die im folgenden aufgelisteten Plasmide und/oder Mikroorganismen gemäss den Bestimmungen des Budapester Vertrages bei der als Internationale Hinterlegungsstelle anerkannten "American Type Culture Collection" in Rockville, Maryland hinterlegt. 40

- 1) *Escherichia coli* ATCC 67329  
MC1061, pCIB10/35Sbt 45  
(Hinterlegungsdatum:  
27. Februar 1987)
- 2) *Escherichia coli* ATCC 67330  
HB101, pCIB 10/19Sbt 50  
(Hinterlegungsdatum:  
27. Februar 1987)
- 3) Plasmid pLV111 ATCC 40235  
(Hinterlegungsdatum:  
14. Mai 1986)
- 4) Phage  $\lambda$ /rbc-gY ATCC 40486 55  
(Hinterlegungsdatum:  
25. August 1988)
- 5) Phage  $\lambda$ /rbc-gX ATCC 40487 60  
(Hinterlegungsdatum:  
25. August 1988)

Der Hauptgegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Herstellung einer chimären transformierten Baumwollzelle oder -pflanze, die das *Bt* Toxingen enthält.

Die für die Verwendung im Rahmen dieser Erfindung in Frage kommenden Baumwollpflanzenzellen 65

schliessen die Zellen von jeder beliebigen Baumwollpflanze ein, in welche Fremd-DNA eingeführt und in denen sie repliziert und exprimiert werden kann. Geeignete Baumwollpflanzen umfassen beispielsweise die folgenden Spezies: *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum* und *Gossypium barbadense*.

5 Diese beispielhafte Aufzählung dient lediglich der Verdeutlichung der vorliegenden Erfindung und soll den Erfindungsgegenstand in keiner Weise limitieren.

Bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist die Baumwollspezies *Gossypium hirsutum*, die wahlweise dem "Stripper" oder dem "Picker" - Typ angehören kann.

Baumwollsorten vom "Picker" und vom "Stripper"-Typ unterscheiden sich in ihrem Ernteverhalten. Die Kapseln der "Stripper"-Baumwolle sind sehr fest mit der Pflanze verhaftet und werden daher durch die spät in  
10 der Vegetationsperiode auftretenden Stürme nicht beeinträchtigt

Bei der Ernte der "Stripper"-Baumwolle wird die Pflanze jedoch zerstört. Die Kapseln der "Picker"-Baumwolle sind dagegen weniger fest mit der Pflanze verhaftet, sodass die Ernte der "Picker"-Baumwolle ohne grössere Beschädigung der Pflanze möglich ist.

15 Im Folgenden sollen einige Beispiele von kommerziell erhältlichen *G. hirsutum* Varietäten benannt werden, die mit Hilfe des erfindungsgemässen Verfahren regeneriert werden können:

Acala 1515-75, Acala SJ-2, Acala SJ-4, Acala SJ-5, Acala SJC-1, Acala SJC-22, Acala SJC-28, Acala SJC-30, Acala B-1644, Acala B-1810, Acala B-2724, Acala GC-510.

Coker 304, Coker 315, Coker 201, Coker 310, Coker 312,

DP 41, DP 90,

20 DPL 50, DPL 20, DPL 120, DPL 775,

Lankart 611, Lankart 57,

Paymaster 145, Paymaster HS 26,

Stoneville 506, Stoneville 825,

Funk 519-2, Funk FC 3008, Funk FC.3024, Funk & 1568R, Funk FC 2005, Funk C 0947B, Funk FC 2028, Funk FC

25 2017, Funk C 1379,

McNair 235, Tomcot SP 21-S, Siokra, Tx-CAB-CS.

Besonders bevorzugt sind im Rahmen dieser Erfindung die *G. hirsutum* Varietäten Acala SJ-2, Acala SJC-1, Acala GC 510, Acala SJC-28, Acala SJC-30, Acala B-1644 und Siokra.

30 Ganz besonders bevorzugt sind die *G. hirsutum* Varietäten Acala SJ-2, Acala GC 510, Acala B-1644 und Siokra.

Unter dem Ausdruck "Pflanzenzelle" soll im Rahmen dieser Erfindung definitionsgemäss jede von einer Baumwollpflanze abgeleitete Zelle verstanden werden. Einige Beispiele von Zellen, die von der vorliegenden Erfindung umfasst werden, sind differenzierte Zellen, die Teil einer lebenden Pflanze sind, differenzierte und undifferenzierte Zellen in Kultur, die Zellen undifferenzierter Gewebe wie Kallus oder Tumore, sowie die Zellen  
35 von Samen, Embryonen, Vermehrungsgut und Pollen.

Das erfindungsgemässe chimäre Gen enthält einen Promotorabschnitt, der in Baumwollpflanzen mit hoher Effizienz funktioniert, sowie einen kodierenden Abschnitt, der das kristalline Protein von *Bt* oder aber ein Polypeptid kodiert, das im wesentlichen die insektiziden Eigenschaften des kristallinen Proteins von *Bt* besitzt. Es ist nicht bekannt, dass die kodierende Sequenz des chimären Gens in natürlich vorkommenden Genen mit dem Promotor verknüpft wäre.  
40

Die 5'- und/oder 3'-nichttranslatierten Abschnitte können natürlicherweise unabhängig voneinander entweder mit dem Promotor oder dem kodierenden Bereich verknüpft sein oder sie sind weder mit dem Promotor noch mit dem kodierenden Bereich assoziiert. In natürlich vorkommenden Genen ist vorzugsweise entweder der 5'- oder der 3'-nichttranslatierte Abschnitt mit dem Promotor assoziiert, insbesondere aber sind  
45 in natürlich vorkommenden Genen beide, der 5'- und der 3'-Abschnitt, mit dem Promotor assoziiert.

Ausgehend vom Stand der Technik konnte zum Zeitpunkt, als diese Erfindung gemacht wurde, niemand vorhersagen, dass es möglich wäre, ein chimäres Gen stabil und funktionell in Baumwollzellen einzuführen. Es war noch weniger vorhersagbar, dass solche Zellen ein insektizides Polypeptid in beliebigen Mengen exprimieren würden. Insbesondere war nicht vorhersagbar, dass es in einer Menge produziert würde, die  
50 ausreicht, um den Zellen insektizide Eigenschaften zu verleihen. Man konnte vielmehr erwarten, dass es besondere Schwierigkeiten bereiten würde, ein Polypeptid, das so gross und so unlöslich ist wie das Polypeptid, welches die Insektentoxizitätseigenschaften des kristallinen Proteins von *Bt* aufweist, in Pflanzenzellen zu exprimieren.

Um als insektizid angesehen zu werden, müssen die Pflanzenzellen eine insektizid wirksame Menge eines Toxins enthalten, das im wesentlichen die insektizide Aktivität des kristallinen Proteins von *Bt* aufweist. Unter einer insektizid-wirksamen Menge an Toxin soll im Rahmen dieser Erfindung eine in der Pflanzenzelle vorliegende Toxinkonzentration verstanden werden, die ausreicht, die Insektenlarven abzutöten oder aber  
55 zumindest ihre Nahrungsaufnahme in substantieller Weise zu reduzieren. Dementsprechend können die erfindungsgemässen Pflanzenzellen Angriffen von Insektenlarven widerstehen, wobei keine oder aber weitaus geringere Mengen des kristallinen Proteins oder anderer Insektizide appliziert werden müssen, verglichen mit Pflanzenzellen, die kein Gen enthalten, das ein insektizides Polypeptid kodiert.  
60

Das chimäre Gen dieser Erfindung enthält Transkriptionskontrollsequenzen wie z.B. Promotor und 5'- und 3'-nichttranslatierte Sequenzen, die in Baumwollpflanzen funktionsfähig sind. Diese Sequenzen können unabhängig voneinander aus irgendeiner beliebigen Quelle stammen, wie beispielsweise aus Virus-, Pflanzen- oder Bakterien-  
65



Die Viruspromotoren sowie die 5'- und 3'-nichttranslatierten Sequenzen, die für die erfindungsgemässe Verwendung geeignet sind, funktionieren in Baumwollpflanzen und können beispielsweise aus Pflanzenviren, wie dem *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV) erhalten werden. Das CaMV-Virus ist von Hohn et al. (1982) 194-220 im Detail charakterisiert und beschrieben worden (Appendix A bis G). Diese Beschreibung ist ein integraler Bestandteil dieser Erfindung.

CaMV ist ein atypisches Pflanzenvirus, weil es doppelsträngige DNA enthält. Wenigstens zwei CaMV-Promotoren sind in Pflanzen funktionsfähig, der 19S-Promotor, der bei der Transkription des CaMV Gens VI beteiligt ist, und der 35S-Promotor. Der 19S-Promotor und der 35S-Promotor sind die bevorzugten Pflanzenviruspromotoren für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung.

CaMV 19S-Promotoren und 5'-nichttranslatierte Abschnitte können mit Hilfe einer Restriktionskarte, wie sie in Fig. 4 auf Seite 199 des oben erwähnten Hohn et al.-Artikels angegeben ist, oder mit Hilfe der in Anhang C des Hohn et al.-Artikels wiedergegebenen Sequenz, erhalten werden.

Um den CaMV 19S-Promotor und wahlweise den benachbarten 5'-nichttranslatierten Abschnitt zu isolieren, wird ein Restriktionsfragment des CaMV-Genoms mit den gewünschten Sequenzen ausgewählt. Ein geeignetes Restriktionsfragment, das den 19S-Promotor und die 5'-nichttranslatierte Region enthält, ist das Fragment zwischen der PstI-Schnittstelle, beginnend an Position 5386, und der HindIII-Schnittstelle, beginnend an Position 5850 der in Fig. 4 wiedergegebenen Restriktionskarte bzw. der in Anhang C des Hohn et al.-Artikels wiedergegebenen Sequenz.

Wie weiter unten beschrieben, kann durch analoge Verfahren der 35S-Promotor von CaMV erhalten werden.

Unerwünschte Nukleotide in dem Restriktionsfragment können gegebenenfalls mit Hilfe von Standardverfahren entfernt werden. Unerwünschte Nukleotide können beispielsweise durch den Gebrauch von Exonukleasen (Maniatis et al., 1982) oder durch eine Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese (Zoller und Smith, 1983) deletiert werden.

Ein ähnliches Verfahren kann benutzt werden, um gegebenenfalls eine wünschenswerte 3'-nichttranslatierte Region zu erhalten. So kann man beispielsweise eine geeignete 3'-nichttranslatierte Sequenz des CaMV 19S-Gens erhalten, indem man die Region zwischen der EcoRV-Schnittstelle an Position 7342 und der BglII-Schnittstelle an Position 7643 des in Fig. 4 bzw. im Anhang & des Hohn et al.-Artikels beschriebenen CaMV-Genoms, isoliert.

Beispiele für Pflanzengen-Promotoren und 5'- sowie 3'-nichttranslatierte Regionen, die für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, schliessen auch die Promotoren der Gene mit ein, welche die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase und das Chlorophyll a/b-Bindungsprotein kodieren. Diese Pflanzengenregionen können auf vergleichbare Art und Weise isoliert werden, wie dies zuvor für die Isolierung der entsprechenden Regionen des CaMV Genoms beschrieben wurde (Morelli et al., 1985).

Ebenso geeignet für die Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind die Promotoren und 5'- sowie 3'-nichttranslatierten Regionen, die sich in der T-DNA-Region von *Agrobacterium*-Plasmiden befinden. Einige Beispiele geeigneter *Agrobacterium*-Plasmide umfassen das Ti-Plasmid von *A. tumefaciens* und das Ri-Plasmid von *A. rhizogenes*. Besonders bevorzugt für die Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind *Agrobacterium*-Promotoren sowie 5'- und 3'-nichttranslatierte Regionen, die in den für die Oktopin- und die Nopalins-Synthase kodierenden Genen vorliegen. Diese Sequenzen können durch ähnliche Verfahren erhalten werden, wie sie oben für die Isolierung von CaMV- und Pflanzenpromotoren sowie für die nichttranslatierten Sequenzen beschrieben sind (Bevan et al., 1983).

Die kodierende Region des chimären Gens enthält eine Nukleotidsequenz, die ein Polypeptid kodiert, welches im wesentlichen die Toxizitätseigenschaften eines kristallinen  $\delta$ -Endotoxin Proteins von *Bt* aufweist. Für den erfindungsgemässen Anwendungszweck weist ein Polypeptid definitionsgemäss dann im wesentlichen die Toxizitätseigenschaften des kristallinen  $\delta$ -Endotoxin Proteins von *Bt* auf, wenn es gegen ein ähnliches Spektrum von Insekten-Larven insektizid wirkt, wie das kristalline Protein irgendeiner beliebigen Unterart von *Bt*. Einige geeignete Unterarten sind beispielsweise solche, ausgewählt aus der Gruppe *Bt* var. *kurstaki*, *Bt* var. *berliner*, *Bt* var. *alesti*, *Bt* var. *tolworthi*, *Bt* var. *sotto*, *Bt* var. *dendrolimus*, *Bt* var. *tenebrionis*, *Bt* var. *san diego* und *Bt* var. *aizawai*. Die bevorzugte Unterart ist *Bt* var. *kurstaki* und insbesondere *Bt* var. *kurstaki* HD1.

Bei der kodierenden Region kann es sich um eine Region handeln, die natürlicherweise in *Bt* vorkommt. Alternativ dazu kann die kodierende Region gegebenenfalls aber auch eine Sequenz enthalten, die sich von der Sequenz in *Bt* unterscheidet, die ihr aber aufgrund der Degenerierung des genetischen Codes äquivalent ist.

Die kodierende Region des chimären Gens kann auch ein Polypeptid kodieren, das sich von einem natürlich vorkommenden kristallinen  $\delta$ -Endotoxin Protein unterscheidet, das aber immer noch im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften des kristallinen Proteins aufweist. Dabei wird es sich üblicherweise um eine Variante einer natürlichen kodierenden Region handeln. Unter einer "variante" einer natürlichen DNA-Sequenz ist im Rahmen dieser Erfindung definitionsgemäss eine modifizierte Form einer natürlichen Sequenz zu verstehen, die aber noch dieselbe Funktion erfüllt. Die Variante kann eine Mutante oder eine synthetische DNA-Sequenz sein und ist im wesentlichen der entsprechenden natürlichen Sequenz homolog.

Unter dem Begriff einer "im wesentlichen homologen Sequenz" soll im Rahmen dieser Erfindung definitionsgemäss entweder a) ein DNA Fragment verstanden werden, das eine ausreichend hohe Ähnlichkeit mit einem zweiten DNA Fragment aufweist, sodass es in der Lage ist, auch ein Polypeptid zu exprimieren, das ähnliche Eigenschaften zeigt; oder aber b) ein Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz

besitzt, die eine ausreichend hohe Aehnlichkeit mit einer zweiten Aminosäuresequenz aufweist, sodass sie in der Folge auch ähnliche Eigenschaften zeigt.

Normalerweise ist im Rahmen dieser Erfindung eine DNA-Sequenz einer zweiten DNA-Sequenz dann im wesentlichen homolog, wenn mindestens 70 % vorzugsweise mindestens 80 % und ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % der aktiven Abschnitte der DNA-Sequenz homolog sind. Für die Ermittlung der Homologie werden zwei unterschiedliche Nukleotide in einer DNA-Sequenz einer kodierenden Region dann als homolog angesehen, wenn der Austausch des einen Nukleotids gegen das andere eine stille Mutation darstellt.

Die Erfindung umfasst somit Baumwollzellen und -pflanzen, die irgendein beliebiges chimäres Gen enthalten, das eine Aminosäuresequenz kodiert welche die insektiziden Eigenschaften aufweist, die mit den offenbarten und beanspruchten Erfordernissen in Einklang stehen. Besonders bevorzugt ist eine Nukleotidsequenz, die im wesentlichen wenigstens dem Teil oder den Teilen der natürlichen Sequenz homolog ist, die für die insektizide Aktivität verantwortlich ist (sind).

Das Polypeptid, welches durch das erfindungsgemässe chimäre Gen exprimiert wird, hat in der Regel auch zumindest einige immunologische Eigenschaften mit einem natürlichen *Bt* Kristallprotein gemeinsam, da es wenigstens zum Teil die gleichen antigenen Determinanten besitzt.

Dementsprechend ist das Polypeptid, das von dem chimären Gen der vorliegenden Erfindung kodiert wird, vorzugsweise strukturell mit dem kristallinen  $\delta$ -Endotoxin von *Bt* verwandt. *Bt* produziert ein kristallines Protein, das einem Protoxin mit einem Mr von etwa 130 000 bis 140 000 entspricht. Dieses Protoxin kann durch Proteasen oder durch Alkali in insektizide Fragmente mit einem Mr von etwa 80 000, vorzugsweise von etwa 70 000, ganz bevorzugt von etwa 60 000 und möglicherweise sogar weniger gespalten werden.

Besagte Fragmente haben ein maximales Molekulargewicht von etwa 120 000, vorzugsweise von etwa 110 000 und ganz besonders bevorzugt von etwa 100 000.

Die Konstruktion chimärer Gene, die erfindungsgemäss solche Protoxinfragmente oder noch kleinere Teile davon kodieren, kann solange fortschreiten, wie die Fragmente oder Teile dieser Fragmente noch die erforderliche insektizide Aktivität aufweisen. Das Protoxin, insektizide Fragmente des Protoxins und insektizide Teile dieser Fragmente können mit anderen Molekülen, wie Polypeptiden und Proteinen, verbunden werden.

Kodierende Regionen, die für eine erfindungsgemässe Verwendung geeignet sind, können von Genen aus *Bt*, die das kristalline Toxinogen kodieren, erhalten werden (siehe z.B. PCT Anmeldung W086/01536 und US Patente 4 448 885 und 4 467 036). Eine bevorzugte Nukleotidsequenz, die ein kristallines Protein kodiert, befindet sich zwischen den Nukleotiden 156 und 3623 der in Formel I wiedergegebenen Sequenz. Ebenfalls bevorzugt ist eine kürzere Nukleotidsequenz, die ein insektizides Fragment eines solchen kristallinen Proteins kodiert. Diese Sequenz ist bei Geiser et al. (1986) publiziert und integraler Bestandteil dieser Erfindung.

Formel I

10	20	30	40	50	60	5
GTTAACACCC	TGGGTCAAAA	ATTGATATTT	AGTAAATA	GTTGCACTTT	GTGCATTTTT	
70	80	90	100	110	120	10
TCATAAGATG	AGTCATATGT	TTTAAATTGT	AGTAATGAAA	AACAGTATTA	TATCATAATG	
130	140	150	160	170	180	
AATTGGTATC	TTAATAAAAG	AGATGGAGGT	AACTTATGGA	TAACAATCCG	AACATCAATG	
190	200	210	220	230	240	15
AATGCATTCC	TTATAATTGT	TAAAGTAACC	CTGAAGTAGA	AGTATTAGGT	GGAGAAAGAA	
250	260	270	280	290	300	20
TAGAAACTGG	TTACACCCCA	ATCGATATTT	CCTTGTCGCT	AACGCAATTT	CTTTTGAGTG	
310	320	330	340	350	360	
AATTTGTTCC	CGGTGCTGGA	TTTGTGTTAG	GACTAGTTGA	TATAATATGG	GGAATTTTTG	
370	380	390	400	410	420	25
GTCCCTCTCA	ATGGGACGCA	TTTCTTGTA	AAATTGAACA	GTTAATTAAAC	CAAAGAATAG	
430	440	450	460	470	480	30
AAGAATTCGC	TAGGAACCAA	GCCATTTCTA	GATTAGAAGG	ACTAAGCAAT	CTTTATCAAA	
490	500	510	520	530	540	
TTTACGCAGA	ATCTTTTAGA	GAGTGGGAAG	CAGATCCTAC	TAATCCAGCA	TTAAGAGAAG	
550	560	570	580	590	600	35
AGATGCGTAT	TCAATTCAAT	GACATGAACA	GTGCCCTTAC	AACCGCTATT	CCTCTTTTTG	
610	620	630	640	650	660	40
CAGTTCAAAA	TTATCAAGTT	CCTCTTTTAT	CAGTATATGT	TCAAGCTGCA	AATTTACATT	
670	680	690	700	710	720	
TATCAGTTTT	GAGAGATGTT	TCAGTGTTTG	GACAAAGGTG	GGGATTTGAT	GCCGCGACTA	
730	740	750	760	770	780	45
TCAATAGTCG	TTATAATGAT	TAACTAGGC	TTATTGGCAA	CTATACAGAT	CATGCTGTAC	
790	800	810	820	830	840	50
GCTGGTACAA	TACGGGATTA	GAGCGTGTAT	GGGGACCGGA	TTCTAGAGAT	TGGATAAGAT	
850	860	870	880	890	900	
ATAATCAATT	TAGAAGAGAA	TTAACACTAA	CTGTATTAGA	TATCGTTTCT	CTATTTCCGA	
910	920	930	940	950	960	55
ACTATGATAG	TAGAACGTAT	CCAATTCGAA	CAGTTTCCCA	ATTAACAAGA	GAAATTTATA	
970	980	990	1000	1010	1020	60
CAAACCCAGT	ATTAGAAAAT	TTTGATGGTA	GTTTTGAGG	CTCGGCTCAG	GGCATAGAAG	
1030	1040	1050	1060	1070	1080	65
GAAGTATTAG	GAGTCCACAT	TTGATGGATA	TACTTAACAG	TATAACCATC	TATACGGATG	

EP 0 317 511 A2

	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	CTCATAGAGG	AGAATATTAT	TGGTCAGGGC	ATCAAATAAT	GGCTTCTCCT	GTAGGGTTTT
5	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	CGGGGCCAGA	ATTCACCTTT	CCGCTATATG	GAACATATGGG	AAATGCAGCT	CCACAACAAC
10	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	GTATTGTTGC	TCAACTAGGT	CAGGGCGTGT	ATAGAACATT	ATCGTCCACT	TTATATAGAA
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	GACCTTTTAA	TATAGGGATA	AATAATCAAC	AACATATCTGT	TCTTGACGGG	ACAGAATTG
15	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	CTTATGGAAC	CTCCTCAAAT	TTGCCATCCG	CTGTATACAG	AAAAAGCGGA	ACGGTAGATT
20	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	CGCTGGATGA	AATACCGCCA	CAGAATAACA	ACGTGCCACC	TAGGCAAGGA	TTTAGTCATC
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	GATTAAGCCA	TGTTTCAATG	TTTCGTTTCA	GCTTTAGTAA	TAGTAGTGTA	AGTATAATAA
25	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	GAGCTCCTAT	GTTCTCTTGG	ATACATCGTA	GTGCTGAATT	TAATAATATA	ATTCCCTTCAT
30	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	CACAAATTAC	ACAAATACCT	TAAACAAAAT	CTACTAATCT	TGGCTCTGGA	ACTTCTGTCTG
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	TTAAAGGACC	AGGATTTTACA	GGAGGAGATA	TTCTTCGAAG	AACTTCACCT	GGCCAGATTT
35	1690	1700	1710	1720	1730	1740
	CAACCTTAAG	AGTAAATATT	ACTGCACCAT	TATCACAAAG	ATATCGGGTA	AGAATTCGCT
40	1750	1760	1770	1780	1790	1800
	ACGCTTCTAC	CACAAATTTA	CAATTCCATA	CATCAATTGA	CGGAAGACCT	ATTAATCAGG
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
	GGAATTTTTC	AGCAACTATG	AGTAGTGGGA	GTAATTTACA	GTCCGGAAGC	TTTAGGACTG
45	1870	1880	1890	1900	1910	1920
	TAGGTTTTAC	TACTCCGTTT	AACTTTTCAA	ATGGATCAAG	TGTATTTACG	TTAAGTGCTC
50	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	ATGTCTTCAA	TTCAGGCAAT	GAAGTTTATA	TAGATCGAAT	TGAATTTGTT	CCGGCAGAAG
	1990	2000	2010	2020	2030	2040
	TAACCTTTGA	GGCAGAATAT	GATTTAGAAA	GAGCACAAAA	GGCGGTGAAT	GAGCTGTTTA
55	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	CTTCTTCCAA	TCAAATCGGG	TTAAAAACAG	ATGTGACGGA	TTATCATATT	GATCAAGTAT
60	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	CCAATTTAGT	TGAGTGTTTA	TCTGATGAAT	TTTGTCTGGA	TGAAAAAAA	GAATTGTCCG

65

EP 0 317 511 A2

2170	2180	2190	2200	2210	2220	
AGAAAGTCAA	ACATGCGAAG	CGACTTAGTG	ATGAGCGGAA	TTTACTTCAA	GATCCAAACT	
2230	2240	2250	2260	2270	2280	5
TTAGAGGGAT	CAATAGACAA	CTAGACCGTG	GCTGGAGAGG	AAGTACGGAT	ATTACCATCC	
2290	2300	2310	2320	2330	2340	10
AAGGAGGCGA	TGACGTATTC	AAAGAGAATT	ACGTTACGCT	ATTGGGTACC	TTTGATGAGT	
2350	2360	2370	2380	2390	2400	
GCTATCCAAC	GTATTTATAT	CAAAAAATAG	ATGAGTCGAA	ATTAAAAGCC	TATACCCGTT	
2410	2420	2430	2440	2450	2460	15
ACCAATTAAG	AGGGTATATC	GAAGATAGTC	AAGACTTAGA	AATCTATTTA	ATTCGCTACA	
2470	2480	2490	2500	2510	2520	20
ATGCCAAACA	CGAAACAGTA	AATGTGCCAG	GTACGGGTTC	CTTATGGCCG	CTTTCAGCCC	
2530	2540	2550	2560	2570	2580	
CAAGTCCAAT	CGGAAAATGT	GCCCATCATT	CCCATCATTT	CTCCTTGGAC	ATTGATGTTG	
2590	2600	2610	2620	2630	2640	25
GATGTACAGA	CTTAAATGAG	GACTTAGGTG	TATGGGTGAT	ATTCAAGATT	AAGACGCAAG	
2650	2660	2670	2680	2690	2700	30
ATGGCCATGC	AAGACTAGGA	AATCTAGAAT	TTCTCGAAGA	GAAACCATTA	GTAGGAGAAG	
2710	2720	2730	2740	2750	2760	
CACTAGCTCG	TGTGAAAAGA	GCGGAGAAAA	AATGGAGAGA	CAAACGTGAA	AAATTGGAAT	
2770	2780	2790	2800	2810	2820	35
GGGAAACAAA	TATTGTTTAT	AAAGAGGCAA	AAGAATCTGT	AGATGCTTTA	TTTGTAACCT	
2830	2840	2850	2860	2870	2880	40
CTCAATATGA	TAGATTACAA	GCGGATACCA	ACATCGCGAT	GATTCATGCG	GCAGATAAAC	
2890	2900	2910	2920	2930	2940	
GCGTTCATAG	CATTCGAGAA	GCTTATCTGC	CTGAGCTGTC	TGTGATTCCG	GGTGTCAATG	
2950	2960	2970	2980	2990	3000	45
CGGCTATTTT	TGAAGAATTA	GAAGGGCGTA	TTTTCACTGC	ATTCTCCCTA	TATGATGCGA	
3010	3020	3030	3040	3050	3060	50
GAAATGTCAT	TAAAAATGGT	GATTTTAATA	ATGGCTTATC	CTGCTGGAAC	GTGAAAGGGC	
3070	3080	3090	3100	3110	3120	55
ATGTAGATGT	AGAAGAACAA	AACAACCACC	GTTCCGTCCT	TGTTGTTCCG	GAATGGGAAG	
3130	3140	3150	3160	3170	3180	
CAGAAAGTGC	ACAAGAAGTT	CGTGTCTGTC	CGGGTCGTGG	CTATATCCTT	CGTGTACACAG	
3190	3200	3210	3220	3230	3240	60
CGTACAAGGA	GGCATATGGA	GAAGGTTGCG	TAACCATTCA	TGAGATCGAG	AACAATACAG	
3250	3260	3270	3280	3290	3300	65
ACGAACTGAA	GTTTAGCAAC	TGTGTAGAAG	AGGAAGTATA	TCCAAACAAC	ACGGTAACGT	

EP 0 317 511 A2

	3310	3320	3330	3340	3350	3360
	GTAATGATTA	TACTGCCACT	CAAGAAGAAT	ATGAGGGTAC	GTACACTTCT	CGTAATCGAG
5	3370	3380	3390	3400	3410	3420
	GATATGACGG	AGCCTATGAA	AGCAATTCTT	CTGTACCAGC	TGATTATGCA	TCAGCCTATG
	3430	3440	3450	3460	3470	3480
10	AAGAAAAAGC	ATATACAGAT	GGACGAAGAG	ACAATCCTTG	TGAATCTAAC	AGAGGATATG
	3490	3500	3510	3520	3530	3540
	GGGATTACAC	ACCACTACCA	GCTGGCTATG	TGACAAAAGA	ATTAGAGTAC	TTCCCAGAAA
15	3550	3560	3570	3580	3590	3600
	CCGATAAGGT	ATGGATTGAG	ATCGGAGAAA	CGGAAGGAAC	ATTCATCGTG	GACAGCGTGG
	3610	3620	3630	3640	3650	3660
20	AATTACTTCT	TATGGAGGAA	TAATATATGC	TTTATAATGT	AAGGTGTGCA	AATAAAGAAT
	3670	3680	3690	3700	3710	3720
	GATTACTGAC	TTGTATTGAC	AGATAAATAA	GGAAATTTTT	ATATGAATAA	AAAACGGGCA
25	3730	3740	3750	3760	3770	3780
	TCACTCTTAA	AAGAATGATG	TCCGTTTTTT	GTATGATTTA	ACGAGTGATA	TTTAAATGTT
	3790	3800	3810	3820	3830	3840
30	TTTTTTGCGA	AGGCTTTACT	TAACGGGGTA	CCGCCACATG	CCCATCAACT	TAAGAATTTG
	3850	3860	3870	3880	3890	3900
	CACTACCCCC	AAGTGTCAAA	AAACGTTATT	CTTTCTAAAA	AGCTAGCTAG	AAAGGATGAC
35	3910	3920	3930	3940	3950	3960
	ATTTTTTATG	AATCTTTCAA	TTCAAGATGA	ATTACAATA	TTTTCTGAAG	AGCTGTATCG
	3970	3980	3990	4000	4010	4020
40	TCATTTAACC	CCTTCTCTTT	TGGAAGAACT	CGCTAAAGAA	TTAGGTTTTG	TAAAAAGAAA
	4030	4040	4050	4060	4070	4080
	ACGAAAGTTT	TCAGGAAATG	AATTAGCTAC	CATATGTATC	TGGGGCAGTC	AACGTACAGC
45	4090	4100	4110	4120	4130	4140
	GAGTGATTCT	CTCGTTCGAC	TATGCAGTCA	ATTACACGCC	GCCACAGCAC	TCTTATGAGT
	4150	4160	4170	4180	4190	4200
50	CCAGAAGGAC	TCAATAAACG	CTTTGATAAA	AAAGCGGTTG	AATTTTTGAA	ATATATTTTT
	4210	4220	4230	4240	4250	4260
	TCTGCATTAT	GGAAAAGTAA	ACTTTGTAAA	ACATCAGCCA	TTTCAAGTGC	AGCACTCAGC
55	4270	4280	4290	4300	4310	4320
	TATTTTCAAC	GAATCCGTAT	TTTAGATGCG	ACGATTTTCC	AAGTACCGAA	ACATTTAGCA
	4330	4340	4350	4360		
60	CATGTATATC	CTGGGTCAGG	TGGTTGTGCA	CAAACGTGAG		

65

Die durch die Nukleotide 156 bis 3623 der in Formel I wiedergegebenen Sequenz definierte kodierende Region kodiert ein Polypeptid der Formel II.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Formel II

5	Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys	10
	Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser Asn Pro Glu	20
	Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu	30
10	Thr Gly Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu	40
	Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser Glu Phe	50
	Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu	60
15	Val Asp Ile Ile Trp Gly Ile Phe Gly Pro	70
	Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile	80
	Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu	90
20	Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile Ser Arg Leu	100
	Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr	110
	Ala Glu Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp	120
25	Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu Met	130
	Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala	140
	Leu Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val	150
30	Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val	160
	Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser	170
	Val Leu Arg Asp Val Ser Val Phe Gly Gln	180
35	Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn	190
	Ser Arg Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile	200
	Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val Arg Trp	210
40	Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly	220
	Pro Asp Ser Arg Asp Trp Ile Arg Tyr Asn	230
	Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val	240
45	Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr	250
	Asp Ser Arg Thr Tyr Pro Ile Arg Thr Val	260
	Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn	270
50	Pro Val Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe	280
	Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu Gly Ser	290
	Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu	300
55	Asn Ser Ile Thr Ile Tyr Thr Asp Ala His	310

60

65



Arg Gly Glu Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln	320	
Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly	330	
Pro Glu Phe Thr Phe Pro Leu Tyr Gly Thr	340	5
Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile	350	
Val Ala Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg	360	
Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg Arg Pro	370	10
Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu	380	
Ser Val Leu Asp Gly Thr Glu Phe Ala Tyr	390	
Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val	400	15
Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu	410	
Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asn Asn Asn Val	420	
Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu	430	20
Ser His Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe	440	
Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile Arg Ala	450	
Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala	460	25
Glu Phe Asn Asn Ile Ile Pro Ser Ser Gln	470	
Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr	480	
Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys	490	30
Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu	500	
Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr	510	
Leu Arg Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser	520	35
Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr Ala	530	
Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser	540	
Ile Asp Gly Arg Pro Ile Asn Gln Gly Asn	550	40
Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn	560	
Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly	570	
Phe Thr Thr Pro Phe Asn Phe Ser Asn Gly	580	45
Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val	590	
Phe Asn Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp	600	
Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu Val Thr	610	50
Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala	620	
Gln Lys Ala Val Asn Glu Leu Phe Thr Ser	630	
Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val	640	55
Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn	650	
Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys	660	
Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys	670	60
Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu	680	

65

	Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg	690
	Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp	700
5	Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly	710
	Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val	720
	Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr	730
10	Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu	740
	Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln	750
	Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp	760
15	Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala	770
	Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr	780
	Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser	790
20	Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His	800
	His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys	810
	Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp	820
25	Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly	830
	His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu	840
	Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu	850
30	Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp	860
	Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu	870
	Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu	880
35	Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln	890
	Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile	900
	Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val	910
40	His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu	920
	Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala	930
	Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe	940
45	Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn	950
	Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly	960
	Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val	970
50	Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser	980
	Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu	990
	Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly	1000
55	Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr	1010
	Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr	1020
	Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu	1030
60	Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu	1040
	Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn	1050

65

Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu	1060	
Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr	1070	
Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val	1080	5
Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu	1090	
Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn	1100	
Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp	1110	10
Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr	1120	
Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp	1130	
Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu	1140	15
Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu	1150	
Leu Leu Met Glu Glu End	1156	20

Die vorliegende Erfindung umfasst somit auch Polypeptide mit der Aminosäuresequenz der Formel (II) oder insektizid wirksame Teile davon.

Darüberhinaus hat es sich gezeigt, dass die Toxine einiger *Bt*-Stämme gegen andere Insekten als Lepidopteren toxisch wirken. So ist beispielsweise das Toxin von *Bt* var. *tenebrionis* spezifisch gegenüber Coleopteren toxisch.

Die Toxizität des *Bt*-Stammes *san diego* gegenüber Coleopteren und die Sequenz des entsprechenden Toxingens sind in den Europäischen Patentanmeldungen EP-0,202,739 und EP-0,213,818 offenbart.

Um das erfindungsgemässe chimäre Gen in Pflanzenzellen einzuführen, wird das Gen zuerst in einen Vektor eingebaut. Wenn das entsprechende Gen nicht in einer Menge zur Verfügung steht, die für eine Einschleusung in Pflanzenzellen ausreicht, besteht die Möglichkeit, den Vektor zunächst durch Replikation in einer Wirtszelle zu amplifizieren. Am besten geeignet für die Amplifikation von Genen sind Bakterien- oder Hefezellen. Wenn eine ausreichende Menge des chimären Gens zur Verfügung steht, wird es in Baumwollzellen oder -gewebe eingeschleust. Die Einführung des Gens in Baumwollzellen oder -gewebe kann mit Hilfe des gleichen Vektors, der zur Replikation genutzt wurde, oder aber mit einem anderen Vektor durchgeführt werden.

Einige Beispiele für bakterielle Wirtszellen, die für eine Replikation des chimären Gens geeignet sind, umfassen Bakterien, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Gattungen *Escherichia*, wie *E. coli*, und *Agrobacterium*, wie *A. tumefaciens* oder *A. rhizogenes*. Verfahren der Klonierung heterologer Gene in Bakterien sind in den US Patenten 4,237,224 und 4,468,464 beschrieben.

Die Replikation in *E. coli* von Genen, die das kristalline Protein von *Bt* kodieren, wird von Wong et al. (1983) beschrieben.

Die im Rahmen dieser Erfindung bevorzugte bakterielle Wirtszelle für die Amplifikation der chimären *Bt* Gene ist *Agrobacterium*. Der Vorteil einer Amplifikation von Genen in *Agrobacterium* besteht darin, dass das Agrobakterium anschliessend direkt für die Einschleusung der amplifizierten Gene in die pflanzliche Zelle verwendet werden kann, ohne dass weitere genetische Manipulationen notwendig werden.

Hefewirtszellen, die sich zur Replikation der erfindungsgemässen Gene eignen, schliessen beispielsweise solche aus der Gattung *Saccharomyces* ein.

Für die Amplifikation der erfindungsgemässen Gene kann jeder beliebige Vektor verwendet werden, in den das chimäre Gen eingebaut werden kann und der sich in einer geeigneten Wirtszelle, wie z.B. in Bakterien oder Hefe, repliziert. Der Vektor kann beispielsweise von einem Phagen oder einem Plasmid abgeleitet sein. Beispiele für Vektoren, die von Phagen abgeleitet sind und im Rahmen dieser Erfindung verwendet werden können, umfassen Vektoren, die sich von M13- und von  $\lambda$ -Phagen ableiten. Als Beispiele für Vektoren, die von M13-Phagen abgeleitet sind, seien hier M13mp18 und M13mp19 genannt. Einige geeignete, von  $\lambda$ -Phagen abgeleitete Vektoren schliessen  $\lambda$ gt11,  $\lambda$ gt7 und  $\lambda$ Charon4 ein.

Vektoren, die von Plasmiden abgeleitet und ganz besonders für die Replikation in Bakterien geeignet sind, umfassen beispielsweise pBR322 (Bolivar et al., 1977), pUC18 und pUC19 (Norrand et al., 1983) sowie die Ti-Plasmide (Bevan et al., 1983). Die bevorzugten Vektoren zur Amplifikation von Genen in Bakterien sind pBR322, pUC18 und pUC19.

Um ein für die Replikation in Bakterien geeignetes chimäres Gen zu konstruieren, werden eine Promotorsequenz, eine 5'-nichttranslatierte Sequenz, eine kodierende Sequenz und eine 3'-nichttranslatierte Sequenz zusammen in einen Vektor eingespleisst oder aber in der richtigen Reihenfolge in einem der zuvor beschriebenen Vektoren zusammengebaut. Geeignete Vektoren sind erfindungsgemäss solche, die in der Lage sind, sich in der Wirtszelle zu replizieren.

Der Promotor, die 5'-nichttranslatierte Region, die kodierende Region und die 3'-nichttranslatierte Region, die zusammen das erfindungsgemässe chimäre Gen bilden, können zuerst ausserhalb des Vektors als eine Einheit zusammengefasst und dann als Ganzes in den Vektor eingespleisst werden. Alternativ dazu können aber auch Teile des chimären Gens einzeln in den Vektor eingebaut werden.

Der Vektor enthält darüberhinaus vorzugsweise auch ein Gen, welches der Wirtszelle eine Eigenschaft verleiht, die eine Selektionierung derjenigen Zellen erlaubt, die den Vektor enthalten. Die bevorzugte Eigenschaft ist eine Antibiotikaresistenz. Als Beispiele für Antibiotika, die in diesem Zusammenhang geeignet sind, seien Ampicillin, Tetracyclin, Hygromycin, G418, Chloramphenicol, Kanamycin und Neomycin genannt.

Der Einbau des Gens in den Vektor bzw. der Zusammenbau des Gens im Vektor wird mit Hilfe von Standardverfahren durchgeführt, beispielsweise unter Verwendung von rekombinanter DNA (Maniatis *et al.*, 1982) und Anwendung der homologen Rekombination (Hinnen *et al.*, 1978).

Die Verfahren der rekombinanten DNA-Technologie beruhen darauf, dass der Vektor zunächst geschnitten und die gewünschte DNA-Sequenz zwischen die geschnittenen Stücke des Vektors eingefügt wird; die Enden der gewünschten DNA-Sequenz werden anschliessend mit den entsprechenden Enden des Vektors verknüpft.

Der Vektor wird vorzugsweise mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten. Geeignete Restriktionsendonukleasen sind beispielsweise solche, die glatte Enden bilden, wie SmaI, HpaI und EcoRV, sowie solche, die kohäsive Enden bilden, wie EcoRI, SacI und BamHI.

Die gewünschte DNA-Sequenz existiert normalerweise als Teil eines grösseren DNA-Moleküls, wie eines Chromosoms, eines Plasmids, eines Transposons oder eines Phagen. Die gewünschte DNA-Sequenz wird in diesen Fällen aus ihrer ursprünglichen Quelle herausgeschnitten und gegebenenfalls so modifiziert, dass ihre Enden mit denen des geschnittenen Vektors verbunden werden können. Wenn die Enden der gewünschten DNA-Sequenz und des geschnittenen Vektors glatte Enden sind, werden sie mit für glatte Enden spezifischen Ligasen, wie z.B. der T4 DNA-Ligase, miteinander verknüpft.

Die Verknüpfung der Enden einer gewünschten DNA-Sequenz mit den Enden des geschnittenen Vektors kann auch in Form von kohäsiven Enden erfolgen, wobei eine für kohäsive Enden spezifische Ligase benutzt wird; auch in diesem Fall kann es sich dabei um eine T4 DNA-Ligase handeln. Eine andere geeignete, für kohäsive Enden spezifische Ligase ist beispielsweise die *E. coli* DNA-Ligase.

Kohäsive Enden werden zweckmässigerweise dadurch gebildet, dass man die gewünschte DNA-Sequenz und den Vektor mit der gleichen Restriktionsendonuklease schneidet. In diesem Fall haben die gewünschte DNA-Sequenz und der geschnittene Vektor kohäsive Enden, die einander komplementär sind.

Die kohäsiven Enden können aber auch artifiziell konstruiert werden, indem man mit Hilfe der terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase komplementäre, homopolymere Schwänze an die Enden der gewünschten DNA-Sequenz und des geschnittenen Vektors anhängt. Alternativ dazu können kohäsive Enden aber auch dadurch hergestellt werden, dass man eine synthetische Oligonukleotid-Sequenz, die von einer bestimmten Restriktionsendonuklease erkannt wird und die unter der Bezeichnung Linker bekannt ist, anhängt und anschliessend die Sequenz mit der Endonuklease spaltet (siehe beispielsweise Maniatis *et al.*, 1982).

Die erfindungsgemässen *Bt* Toxingene können direkt in die pflanzliche Zelle eingeschleust werden, unter Verwendung bestimmter, in *Agrobacterium* vorkommender Plasmide. Diese Plasmide enthalten Regionen, die im Zuge einer *Agrobacterium*-Infektion natürlicherweise in das Genom pflanzlicher Zellen eingebaut werden. Die eingebauten Abschnitte werden als T-DNA ("transferierte DNA") bezeichnet.

Besagte Plasmide, zu denen beispielsweise das Ti-Plasmid (Tumorinduzierendes Plasmid) von *A. tumefaciens* gehört sowie das Ri-Plasmid [Wurzel ("root") induzierendes Plasmid] von *A. rhizogenes*, besitzen sogenannte T-DNA Grenzsequenzen, die beide oder möglicherweise zumindest eine für den Transfer der T-DNA Region vom Plasmid auf das Genom der infizierten pflanzlichen Zelle notwendig sind.

Die natürlicherweise vorkommende Ti- und Ri-Plasmide enthalten darüberhinaus noch sogenannte Virulenz-Regionen. Dabei handelt es sich um DNA-Abschnitte, von denen angenommen wird, dass sie ausserhalb der T-DNA Region lokalisiert sind. Diese Virulenz-Regionen werden für den Transfer der T-DNA in die pflanzliche Zelle benötigt.

In artifiziell modifizierten Systemen können diese Virulenzregionen auch auf anderen Plasmiden vorliegen als auf dem T-DNA enthaltenden Plasmid. Solche, eine Virulenz-Region enthaltende Plasmide, bezeichnet man als Helfer-Plasmide.

Die natürlicherweise vorkommenden T-DNA Regionen sind oncogen und führen zur Ausbildung von Tumoren. Diese oncogenen Abschnitte der T-DNA Regionen können entweder vor oder aber gleichzeitig mit dem Einbau einer gewünschten DNA-Sequenz ganz oder teilweise entfernt werden. Plasmide, die eine auf die zuvor beschriebene Weise modifizierte T-DNA Region enthalten, werden als entschärfte (disarmed) Plasmide bezeichnet.

Die Gene, die für den erfindungsgemässen Verwendungszweck geeignet sind, werden mit Hilfe an sich bekannter Methoden (Barton und Chilton, 1983; Chilton, 1985) in einem T-DNA Vektorsystem zusammengebaut oder aber als eine Einheit in ein solches Vektorsystem eingespleisst.

Der T-DNA Vektor kann dabei oncogen (Hernalsteens *et al.*, 1980), teilweise entschärft ("partially disarmed") (Barton und Chilton, 1983) oder aber vollständig entschärft ("fully disarmed") (Zambryski *et al.*, 1983) sein. Der T-DNA Vektor kann sich darüberhinaus aber auch von artifiziellen T-DNA Vektoren ableiten, die synthetische, T-DNA Grenzsequenzen-ähnliche Strukturen besitzen (Wang *et al.*, 1984).

Stellvertretend für geeignete entschärfte Vektoren, die eine T-DNA Grenzsequenz enthalten, seien hier

pGA436, pGA437 und pGA438 genannt, die bei An et al, 1985 beschrieben sind, desweiteren pMON120 (siehe Fraley et al, 1983) sowie pCIB10 (Rothstein et al, 1987).

Der Transfer der T-DNA wird gewöhnlich durch Inkubation von *Agrobacterium* mit pflanzlichen Zellprotoplasten oder verwundetem pflanzlichem Gewebe erreicht (siehe Caplan et al, 1983).

Zusätzlich zu dem chimären Gen, das ein *Bt* Toxin oder aber ein Toxin, das im wesentlichen die Toxizitätseigenschaften des *Bt* Toxins aufweist, kodiert, enthalten die Vektoren vorzugsweise weiterhin eine DNA-Sequenz, die die Selektionierung oder das Screening von Vektor-haltigen Baumwollpflanzenzellen in Anwesenheit von Zellen ohne Vektor erlaubt. Solche selektier- oder screenbare Marker können entweder bereits natürlicherweise in dem Vektor, der das erfindungsgemässe chimäre Gen eingebaut enthält, vorhanden sein oder sie können entweder vor oder nach dem Einbau des chimären Gens in den Vektor eingefügt werden. Alternativ dazu kann das selektier- oder screenbare Markergen oder ein Teil davon zuerst mit dem gewünschten chimären Gen oder irgendeinem Teil davon verknüpft werden und die auf diese Weise rekombinierten Gene oder Gensegmente können dann als eine Einheit in den Vektor eingespleisst werden. Der selektier- oder screenbare Marker kann selbst chimären Charakter haben.

Der bevorzugte selektierbare Marker ist ein Gen, das Antibiotikaresistenz kodiert. Das Gen muss in den zu transformierenden Zellen zur Expression fähig sein. Die Zellen können dann in einem Antibiotikumhaltigen Medium kultiviert werden, wobei diejenigen Zellen, die den Vektor enthalten und die damit eine verbesserte Ueberlebensfähigkeit in dem Medium aufweisen, selektioniert werden. Alle Gene, die Baumwollpflanzen eine Resistenz gegen Toxine wie Hygromycin, Chloramphenicol, Kanamycin, G418 oder im Prinzip gegenüber jedem beliebigen anderen Antibiotikum verleihen, können als selektierbare Marker verwendet werden.

Als Beispiele für Gene, die Antibiotikaresistenz verleihen, seien das Neomycin-Phosphotransferase-Gen (Kanamycin- und G418-Resistenz, Velten et al., 1984), das Hygromycin-Phosphotransferase-Gen (Hygromycinresistenz, van den Elzen et al., 1985) sowie das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen genannt.

Als Beispiel für ein Gen, das in erster Linie als screenbarer Marker in Gewebekulturen für die Identifizierung von pflanzlichen Zellen geeignet ist, die einen genetisch modifizierten Vektor enthalten, sei ein Gen genannt, das ein Enzym mit einem chromogenen Substrat kodiert. Handelt es sich dabei beispielsweise um ein Gen, welches das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, so werden die transformierten pflanzlichen Zellen auf einem Gewebekultur-Medium ausplattiert, welches das chromogene Substrat Xgal (5-Chlor-4-brom-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid) enthält. Pflanzenzellen, die Kopien des  $\beta$ -Galaktosidase Gens enthalten, werden unter geeigneten Bedingungen durch das aufgrund der enzymatischen Spaltung von Xgal freigesetzte Indigo blau gefärbt.

Die Einschleusung chimärer Gene in die Pflanzen kann erfindungsgemäss unter Verwendung eines beliebigen T-DNA Vektorsystems durchgeführt werden, sofern besagtes Vektorsystem in der Lage ist, Gene von *Agrobacterium* auf Baumwollpflanzenzellen zu übertragen.

Bei dem oben erwähnten Vektorsystem kann es sich beispielsweise um ein co-integriertes System handeln (Comai et al, 1983; Zambryski et al, 1983), wie das "split-end" Vektorsystem (Fraley et al, 1985), das bei Chilton (1985) beschrieben ist.

Als Vektorsystem kann auf der anderen Seite auch ein binäres System verwendet werden (deFramond et al, 1983; Hoekema et al, (1983) oder ein Ti-Plasmid, welches das Gen in die T-DNA eingebaut (Matzke und Chilton, 1981) enthält.

Eine weitere Möglichkeit bildet ein System, worin die T-DNA auf einem Plasmid vorliegt, während sich die Virulenzgene auf der chromosomalen DNA befinden.

Bevorzugt im Rahmen dieser Erfindung ist ein binäres Vektorsystem und zwar insbesondere ein System, welches das Plasmid pCIB10 (Rothstein et al, 1987) beinhaltet (siehe Fig. 10).

Der Einbau heterologer Gene in ein binäres Vektorsystem mit Hilfe der rekombinanten DNA Technologie ist bei Klee et al (1985) beschrieben. Das Einspleissen der Gene in einen T-DNA Vektor kann durch homologe Rekombination unter Verwendung einer doppelten Rekombinationsstrategie (Matzke und Chilton, 1981), einer einfachen Rekombinationsstrategie (Comai et al, 1983; Zambryski et al, 1983), oder aber einer einfachen Rekombinationsstrategie ohne Wiederholungen in der T-DNA (Fraley et al, 1985) erfolgen. Letzteres ist bei Chilton et al (1985) beschrieben.

Werden die das chimäre Gen enthaltenden Vektoren ausserhalb der *Agrobacterium*-Zelle zusammengebaut, so können diese mit Hilfe an sich bekannter Methoden, wie beispielsweise einer Transformation oder einer Konjugation, in *Agrobacterium* eingeschleust werden.

Bei der Transformation werden die Bakterien mit nackter DNA inkubiert. Die Aufnahmefähigkeit der *Agrobacterium*-Zellen für nackte DNA kann durch Einfrieren und anschliessendes Auftauen verbessert werden. Die Transformation von *Agrobacterium* ist bei Holsters et al (1978) beschrieben.

Bei der Konjugation kommt es zu einer Paarung einer den gewünschten Vektor enthaltenden Zelle, gewöhnlich einer *E. coli* Zelle, mit *Agrobacterium*. Diese Methode ist bei Comai et al (1983), sowie bei Chilton et al (1976) beschrieben.

Für den erfindungsgemässen Verwendungszweck kann jede beliebige *Agrobacterium*-Spezies (*Agrobacterium* spp.) verwendet werden, die in der Lage ist, Gene auf Baumwollpflanzenzellen zu übertragen. Geeignete *Agrobacterium*-Spezies sind beispielsweise *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* und *A. radiobacter*.

Transformierte Baumwollpflanzenzellen, die das erfindungsgemässe chimäre Gen enthalten, können entweder in Kultur gehalten oder aber zu ganzen lebenden Pflanzen regeneriert werden. Die Expression erfolgt vorzugsweise mit einer Effizienz, die ausreicht, den pflanzlichen Zellen eine insektizide Wirksamkeit zu verleihen.

Das für die erfindungsgemässe Verwendung in Frage kommende Medium muss in der Lage sein, eine bestimmte pflanzliche Zelle in Kultur am Leben zu erhalten. Seine Zusammensetzung ist abhängig von der jeweils verwendeten Baumwoll-Varietät.

Einige der für den erfindungsgemässen Verwendungszweck geeignete Medien enthalten beispielsweise etwa 10 mg/Liter 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure sowie entweder die anorganischen Salze des Murashige und Skoog Mediums (Murashige und Skoog, 1962) oder des Gamborg B-5 Mediums (Gamborg et al., 1968).

Zur Keimung und zur Regenerierung von Pflanzen befähigte Baumwoll (*Gossypium* spp.)-Embryonen lassen sich in grosser Zahl durch somatische Embryogenese herstellen, indem man von proembryonalen Zellmassen ausgeht und daraus in einem Zellsuspensionskultursystem Embryonen heranzieht.

Mit diesem Verfahren kann man beispielsweise in einem Standard-250 ml-Delong-Gefäss etwa 10 000 globuläre Embryonen erzeugen, aus denen etwa 1000 reife Embryonen und daraus wiederum etwa 50 Pflanzen entstehen. Dabei kann es sich um Zuchtformen oder Wildformen von Baumwollpflanzen handeln. Zuchtformen sind bevorzugt.

#### 15 Schritt a: Embryogener Baumwollkallus

Der erste Schritt besteht in der Induktion der Baumwollkallusbildung aus verpflanztem Baumwollgewebe. Einige Beispiele von geeignetem verpflanztem Baumwollgewebe sind somatische Embryonen, reife und unreife zygotische Embryonen, Keimblätter oder Hypokotyle eines Sämlings und junges Gewebe einer reifen Pflanze. Somatische Embryonen und Sämlingskeimblätter oder -hypokotyle sind dabei bevorzugt.

Beispielsweise können zygotische Embryonen durch Herausschneiden aus Samenanlagen erhalten werden. Die Samenanlagen werden vorzugsweise etwa 7 bis 30 Tage nach der Bestäubung herausgeschnitten, vorzugsweise etwa 10 bis 21 Tage nach der Bestäubung und insbesondere etwa 12 bis 16 Tage nach der Bestäubung.

Keimblätter und Hypokotyle kann man jungen Sämlingen entnehmen. Die Sämlinge sind normalerweise etwa 3 bis 21 Tage alt, bevorzugt etwa 4 bis 9 Tage, insbesondere etwa 7 Tage alt. Hypokotyle werden längs aufgeschnitten und in passende Abschnitte geteilt, beispielsweise in Abschnitten von 1 bis 20 mm, bevorzugt von etwa 2 mm Länge. Das Keimblattgewebe wird in Stücke mit einer Fläche von etwa 1 bis 400 mm<sup>2</sup> geschnitten, bevorzugt von etwa 5 bis 100 mm<sup>2</sup>, insbesondere von etwa 10 mm<sup>2</sup>.

Somatische Embryonen, die sich von dieser Vorgehensweise ableiten, sind eine ganz besonders bevorzugte Quelle, um embryogenen Kallus gemäss dem vorliegenden Verfahren zu erhalten.

Somatische Embryonen können beispielsweise erhalten werden, indem das Verfahren angewendet wird, das oben für Hypokotyl- und Keimblattgewebe als Quelle des verpflanzten Gewebes beschrieben ist. Jeder somatische Embryo, der vor der Entfaltung des Primärblattes genommen wird, ist geeignet. Die Grösse des somatischen Embryos ist nicht kritisch. Bevorzugt sind jedoch somatische Embryonen von weniger als 5 mm Länge.

Junggewebe von ausgewachsenen Baumwollpflanzen wird normalerweise dadurch erhalten, dass man die apikalen 10 cm, vorzugsweise etwa 5 cm der Sprossspitze entnimmt. Stengel und Petiolengewebe werden längs aufgeschnitten und in Abschnitte derselben Grösse wie bei den Hypokotylen (siehe oben) geteilt. Blattgewebe wird in gleich grosse Stücke geschnitten wie das Keimblattgewebe (siehe oben).

Das Baumwollpflanzengewebe wird auf ein zur Kallusinduktion geeignetes Medium, bei etwa 20° bis 40° C, vorzugsweise 23° bis 35° C, insbesondere etwa 31° C gelegt. Jedes Medium, das aus einem Gewebe einen Kallus induzieren kann, kann in diesem Regenerationsverfahren eingesetzt werden. Das Medium kann flüssig oder fest sein, obwohl ein festes Medium bevorzugt ist, weil es bequemer zu handhaben ist.

Ein gemäss vorliegender Erfindung gebräuchliches, die Kallusbildung induzierendes Medium enthält im allgemeinen anorganische Salze sowie Vitamine, eine Kohlenstoffquelle, ein Auxin und ein Cytokinin. Dieses Medium wird auf einen pH zwischen 3,5 und 7,5, bevorzugt zwischen 4,5 und 6,5, insbesondere auf etwa 5,7 eingestellt.

Es sind an sich alle anorganischen Salze sowie Vitamine geeignet, die die Kallusinduktion fördern. Einige Beispiele von geeigneten anorganischen Salzen und von Vitaminen werden von Murashige und Skoog (1962) (MS) sowie Gamborg et al. (1968) (B-5) beschrieben. Ein weiteres Beispiel dafür ist die Modifikation des MS- oder Gamborgs B-5-Mediums, das Cheng et al. (1980) beschreiben. Die bevorzugten anorganischen Salze sind MS anorganische Salze. Die bevorzugten Vitamine sind Gamborgs B-5 Vitamine.

Als geeignete Kohlenstoffquelle kann jede Kohlenstoffquelle eingesetzt werden, auf der Kallus wachsen kann. Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker und Derivate von Zuckern. Bevorzugte Zucker sind Glucose und Saccharose. Es ist besonders wünschenswert, Kallus in einem Kallusinduktionsmedium zu initiieren, das Glucose enthält, damit das Braunwerden des Gewebes verringert wird, und dann den Kallus in ein Kallusinduktionsmedium, das Saccharose enthält, zu übertragen.

Die Konzentration der Kohlenstoffquelle ist 5 bis 60 g/Liter, bevorzugt etwa 30 g/Liter.

Das im Kallusinduktionsmedium vorhandene Auxin kann jedes Auxin sein, das einen Kallus induzieren kann. Einige geeignete Auxine umfassen  $\alpha$ -Naphthalinessigsäure, Picloram, 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Indol-3-buttersäure, Indol-3-milchsäure, Indol-3-bernsteinsäure, Indol-3-essigsäure und p-Chlorphenoxyessigsäure, Indol-3-essigsäure und p-Chlorphenoxyessigsäure. Ein bevorzugtes Auxin ist  $\alpha$ -Naphthalinessigsäure.

Jede Auxinkonzentration, die die Kallusbildung induzieren kann, kann im erfindungsgemässen Verfahren verwendet werden. Besonders geeignete Konzentrationen liegen bei 0,1 bis 10 mg/Liter, insbesondere wenn

$\alpha$ -Naphthalinessigsäure als Auxin eingesetzt wird.

Das im Kallusinduktionsmedium vorhandene Cytokinin kann jedes Cytokinin sein, das einen Kallus induzieren kann. Einige geeignete Cytokinine umfassen Kinetin, 6-Benzyladenin, 2-Isopentenyladenin und Zeatin. Ein bevorzugtes Cytokinin ist Kinetin.

Jede Cytokininkonzentration, die die Kallusbildung induzieren kann, kann im Verfahren der Erfindung eingesetzt werden. Geeignete Konzentrationen liegen bei 0,1 bis 10 mg/Liter. Eine bevorzugte Konzentration ist 1 mg/Liter, insbesondere wenn das Cytokinin Kinetin ist.

Wenn das Medium fest ist, enthält es als Verfestigungsmittel beispielsweise etwa 0,8 % Agar, wie Agar Noble (Difco), oder etwa 0,8 % Agarose. (Alle Prozentangaben in dieser Beschreibung beziehen sich auf das Gewicht.)

Das Gewebe wird einige Zeit auf dem Kallusinduktionsmedium kultiviert, und zwar so lange, bis sich der Kallus bildet. Man kann beispielsweise Gewebe auf einem Kallusinduktionsmedium kultivieren, das Glucose als Kohlenstoffquelle enthält. Eine fünfwöchige Induktionsdauer ist typisch. Ueberimpfungen in frisches Medium und weitere Kultivierung werden durchgeführt, weil sie nötig sind, um Braunwerden zu verhindern. Wöchentliche Ueberimpfungen sind bevorzugt.

Der Kallus, der sich bildet, kann unorganisiert sein, oder er kann proembryonale Zellmassen, embryogenen Kallus oder auch Embryonen enthalten. Normalerweise, wenn Hypokotyle oder Keimblätter als Quelle für das verpflanzte Gewebe verwendet werden, scheint sich bevorzugt unorganisierter Kallus zu bilden. Wenn somatische Embryonen als Quelle für das verpflanzte Gewebe verwendet werden, scheint wenigstens ein Teil des Kallus aus einem embryogenen Kallus zu bestehen, welcher durch eine leicht gelbe Farbe und Knotenbildung charakterisiert ist.

Der resultierende Kallus kann anschliessend für eine Zeitspanne von bis zu 5 Monaten vorteilhafterweise auf ein Kallusweiterkulturmedium übertragen werden, das dem Kallusinduktionsmedium ähnlich ist, aber Saccharose als Kohlenstoffquelle enthält. Man kultiviert den Kallus vorzugsweise für einen Zeitraum von einem Monat auf einem Kallusinduktionsmedium, das Saccharose enthält, oder für einen Zeitraum von zwei Monaten, sollte dann jedoch nach einem Monat auf frisches Medium überimpfen.

Der Kallus kann im Dunkeln induziert werden, wird aber vorzugsweise im Licht induziert. Das Licht kann eine Intensität von beispielsweise 0,5 bis 150  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (= 41,75 bis 12525 lx) haben.

#### Schritt (b): Klumpige Zusammenballungen von proembryonalen Zellmassen

Der Kallus von Schritt (a) wird in einem Flüssigmedium suspendiert, das die Entwicklung von proembryonalen oder sich vermehrenden embryonalen Zellmassen fördert. Es ist wichtig, dass die Zelldichte niedrig ist. Deshalb wird nicht mehr als 40 mg Kallus/ml Kulturmedium, bevorzugt nicht mehr als 15 mg Kallus/ml Kulturmedium und insbesondere nicht mehr als 5 mg Kallus/ml Kulturmedium suspendiert.

Das Medium, brauchbar in Schritt (b), kann jedes Medium sein, das proembryonale Zellmassen induzieren kann. Das Medium enthält im allgemeinen anorganische Salze sowie Vitamine, eine Kohlenstoffquelle und ein Auxin. Das Medium kann auch organische Stickstoffquellen, Cytokinine, Aminosäuren und andere Zusätze enthalten, wie Kaseinhydrolysat oder Kokosmilch.

Die anorganischen Salze und die Vitamine können die gleichen sein wie unter Schritt (a), weiter oben. MS anorganische Salze und B-5-Vitamine sind bevorzugt.

Die Kohlenstoffquelle kann die gleiche sein wie die in Schritt a beschriebene. Saccharose ist bevorzugt. Die Konzentration der Kohlenstoffquelle ist 0,1 bis 100 g/Liter. Etwa 20 g/Liter ist bevorzugt, besonders, wenn die Kohlenstoffquelle Saccharose ist.

Das Auxin kann aus den Auxinen, die in Schritt (a) verwendet werden, ausgewählt sein. Die bevorzugten Auxine sind 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Picloram. Picloram ist besonders bevorzugt.

Die Konzentration des Auxins in Schritt (b) ist relativ niedrig. Die genaue Konzentration hängt von dem spezifischen, verwendeten Auxin ab. Die relativ niedrige Auxinkonzentration ist im allgemeinen ähnlich der, die gewöhnlicherweise in Suspensionskulturmedien verwendet wird, und ist bedeutend niedriger als die entsprechende Auxinkonzentration, die in Schritt (c) verwendet wird. Wenn Picloram das in Schritt (b) verwendete Auxin ist, ist die Konzentration 0,01 bis 5 mg/Liter, bevorzugt 0,1 bis 1 mg/Liter und insbesondere etwa 0,5 mg/Liter. Wenn 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure das in Schritt (b) verwendete Auxin ist, ist die Konzentration 0,01 bis 0,5 mg/Liter, bevorzugt 0,05 bis 0,25 mg/Liter und insbesondere etwa 0,1 mg/Liter.

Die Induktion proembryonaler Zellmassen wird vorzugsweise in einem belüfteten Medium bei einer Temperatur zwischen 20° und 35°C durchgeführt. Bevorzugt sind Temperaturen zwischen 22° und 33°C und insbesondere zwischen 25° und 31°C. Das Medium kann auf jede im Stand der Technik bekannte Weise belüftet werden, beispielsweise durch Schütteln. Schritt (b) kann im Dunkeln durchgeführt werden oder im Licht von bis zu 75  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (= 6262,5 lx), bevorzugt zwischen 5 und 10  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (= 417,5 und 835 lx).

Der Kallus wird vorzugsweise ohne Ueberimpfen in dem Medium gehalten, bis sich klumpige Zusammenballungen von proembryonalen Zellmassen bilden und beginnen, sich rasch zu teilen. Der Ausbruch rascher Teilung erfolgt gewöhnlich nach 3 bis 8 Wochen, typischerweise nach 5 bis 7 Wochen. Während der Induktionsperiode kann das Medium an sich durch frisches Medium ersetzt werden, obwohl es vorzuziehen ist, das Medium während dieser Periode nicht zu ersetzen.

Der Wechsel von Kallus zu klumpigen Zusammenballungen proembryonaler Zellmassen ist für den Fachmann der Pflanzengewebekultur leicht erkennbar. Er ist durch die leicht gelbe Farbe und die klumpige Natur der proembryonalen Zellmassen gekennzeichnet.

Wenn die klumpigen Zusammenballungen der proembryonalen Zellmassen erst einmal begonnen haben, sich rasch zu teilen, können sie direkt in das in Schritt (c) beschriebene Medium eingebracht werden oder in frisches Medium überimpft werden, um das Braunwerden zu verhindern. Ein Ueberimpfen im Zeitraum von 3 bis 7 Tagen, bevorzugt alle 5 bis 7 Tage ist günstig. Ohne Ueberimpfen überleben die Zellmassen etwa vierzehn Tage.

#### Schritt c: Fein dispergierte proembryonale Zellmassen

Die klumpigen Zusammenballungen proembryonaler Zellmassen von Schritt (b) werden in ein Flüssigmedium übertragen, das dazu beiträgt, dass die klumpigen Zusammenballungen der proembryonalen Zellmassen fein dispergiert sind. Das Medium kann dem in Schritt (b) beschriebenen ähnlich sein, sollte aber eine relativ hohe Auxinkonzentration aufweisen. Als Auxin kann jedes in Schritt (a) verwendete Auxin eingesetzt werden. Bevorzugte Auxine sind 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure. Insbesondere bevorzugt ist 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure.

Die Auxinkonzentration hängt von dem einzelnen Auxin ab. Die Auxinkonzentration im Medium von Schritt (c) ist generell höher oder wenigstens am oberen Ende des Konzentrationsbereichs, der gewöhnlicherweise in Suspensionskulturmedien verwendet wird; und ist auf jeden Fall bedeutend höher als die entsprechende Auxinkonzentration in Schritt (b).

Wenn beispielsweise 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure als Auxin in Schritt (c) eingesetzt wird, kann die Konzentration bei etwa 0,5 bis 100 mg/Liter liegen, bevorzugt bei 1 bis 10 mg/Liter und insbesondere bei etwa 2,5 bis 7,5 mg/Liter.

Bis auf die Konzentration und möglicherweise das gewählte Auxin können Medium, Temperatur und Lichtmenge in Schritt (c) gleich sein wie in Schritt (b).

Die Bedingungen von Schritt (c) werden aufrecht erhalten, bis die klumpigen Zusammenballungen der proembryonalen Zellmassen zu kleineren, feiner dispergierten proembryonalen Zellmassen werden. Das Erscheinen der kleineren, feiner dispergierten proembryonalen Zellmassen ist für den Fachmann leicht erkennbar. Diese Zellmassen sind durch ihre gelbe Farbe, glatte Oberfläche, mittlere Dichte und geringe Grösse charakterisiert. Der Uebergang zu den kleineren, feiner dispergierten Zellmassen geschieht gewöhnlich innerhalb von 6 Wochen, typischer noch innerhalb von 2 Wochen.

Die Kultur der kleinen, fein dispergierten proembryonalen Zellmassen kann unbegrenzt aufrecht erhalten werden, und kann überimpft werden, um aktives Wachstum zu erhalten. Es ist günstig, beispielsweise alle 3 bis 28 Tage, bevorzugt alle 5 bis 10 Tage zu überimpfen.

#### Schritt d: Reife Embryonen

Die kleineren, feiner dispergierten proembryonalen Zellmassen werden zu einem Medium, das die Entwicklung reifer Embryonen induziert, hinzugefügt. Das Medium ist vorzugsweise flüssig.

Embryonen durchlaufen eine Anzahl von Entwicklungsstadien, bevor sie reif und fähig sind, zu keimen. Diese Stadien umfassen globuläre, herz- und torpedoförmige sowie reife Stadien. Die Bezeichnungen der Stadien basieren auf dem ungefähren Aussehen der Embryonen.

Das in Schritt (d) brauchbare Medium kann jedes Medium sein, dass die Entwicklung reifer Embryonen zu induzieren vermag. Ein brauchbares Medium enthält im allgemeinen anorganische Salze sowie Vitamine, eine Kohlenstoffquelle und eine organische Verbindung, die reduzierten Stickstoff enthält.

Die Salze und Vitamine sowie deren Konzentrationen können die gleichen sein wie bei Schritt (a). Die Kohlenstoffquelle kann auch wie in Schritt (a) gewählt sein. Die Konzentration der Kohlenstoffquelle ist etwa 1 bis 10 g/Liter, bevorzugt etwa 2 bis 6 g/Liter. Eine bevorzugte Kohlenstoffquelle ist Saccharose.

Die organische Stickstoffquelle kann jede solche Verbindung sein, die, wenn sie dem Medium von Schritt d hinzugefügt wurde, die Entwicklung reifer Embryonen induziert. Die bevorzugten Verbindungen sind Aminosäuren. Eine bevorzugte Aminosäure ist Glutamin.

Die Konzentration der organischen Stickstoffquelle hängt von der eingesetzten Verbindung ab. Eine wirksame Konzentration von Glutamin als organischer Stickstoffquelle liegt bei 2 bis 260 mM, bevorzugt 5 bis 100 mM, insbesondere 10 bis 50 mM.

Das Medium von Schritt (d) kann ein Auxin enthalten. Auxine sind erstrebenswert während der frühen Stadien der Embryonalentwicklung, aber nicht während der späteren Stadien. Deshalb sind sie, falls überhaupt anwesend, vorzugsweise nur bis zum herzförmigen Stadium der Entwicklung einzusetzen. Danach werden die Embryonen in ein Medium, das kein Auxin enthält, übertragen.

Falls vorhanden, kann die Auxinkonzentration bei 0,01 bis 0,1 mg/Liter liegen.

Das Auxin kann eines der in Schritt (a) brauchbaren Auxine sein. Die bevorzugten Auxine sind Picloram und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure.

Die Embryonen können sich im Medium von Schritt (d) bei Temperaturen von 20° bis 35° C im Dunkeln oder im Licht entwickeln. Die Lichtintensität kann beispielsweise 5 bis 75  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (= 6262,5 lx) betragen.

Die Embryonen werden im Medium von Schritt (d) gehalten, bis die Embryonen zu torpedoförmigen oder reifen Stadien herangewachsen sind. Für den mit Pflanzengewebekulturen umgehenden Fachmann sind die globulären, herz- und torpedoförmigen sowie reifen Embryonen klar und einfach zu erkennen. Die Embryonen reifen typischerweise in etwa 2 bis 5 Wochen, gewöhnlicherweise in etwa 3 bis 4 Wochen. Es ist gewöhnlich unnötig, die Embryonen ein weiteres Mal zu kultivieren bzw. die Embryonen in frisches Medium zu übertragen.

Nur im herzförmigen Stadium könnte es vorteilhaft sein, wenn man von einem Auxin-enthaltenden Medium zu



einem-Medium, das kein Auxin enthält, überwechselt.

#### Schritt e: Keimung

Die reifen Embryonen werden auf ein festes Medium aufgebracht, das Keimung induziert. Das Medium enthält anorganische Salze sowie Vitamine und eine Kohlenstoffquelle. Das Medium ist mit einem gebräuchlichen Verfestigungsmittel, wie Gelrite (Kelco, San Diego, Kalifornien), Agarose oder Agar, verfestigt.

Die anorganischen Salze können diejenigen aus Schritt (a) sein, wobei das Nitrat in hohen Konzentrationen vorliegt, während Ammonium fehlt oder in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegen kann. Die Nitratkonzentration beträgt normalerweise 20 bis 60 mM, bevorzugt 30 bis 60 mM, insbesondere 35 bis 45 mM. Die Konzentration der Ammoniumionen sollte 5 mM nicht übersteigen.

Als Kohlenstoffquelle kommt vorzugsweise ein Zucker in Frage. Ein bevorzugter Zucker ist Saccharose. Die Konzentration der Kohlenstoffquelle hängt von der Art der verwendeten Kohlenstoffquelle ab. Wenn beispielsweise Saccharose als Kohlenstoffquelle eingesetzt wird, beträgt deren Konzentration 0,1 bis 6 % (Gewichtsprozent), bevorzugt 0,5 bis 4 %, insbesondere 1 bis 3 %.

Im Medium von Schritt (e) ist fakultativ eine organische Verbindung, die reduzierten Stickstoff enthält, vorhanden. Als bevorzugte organische Verbindungen kommen Aminosäuren oder deren Gemische in Frage, die befähigt sind, die Keimung zu unterstützen. Zu den bevorzugten Aminosäuren oder Mischungen davon gehören Glutamin und Kaseinhydrolysat.

Die Konzentration der organischen Stickstoffquelle hängt im allgemeinen von der Art der speziell verwendeten Verbindung ab. Wenn die Verbindung beispielsweise Glutamin ist, kann deren Konzentration 2 bis 50 mM sein, liegt jedoch bevorzugt bei 5 bis 30 mM, insbesondere bei 10 bis 20 mM. Wenn die Verbindung Kaseinhydrolysat oder modifiziertes Kaseinhydrolysat ist, liegt die Konzentration bei 100 bis 3000 mg/Liter, bevorzugt 1000 bis 2800 mg/Liter, insbesondere bei 1500 bis 2500 mg/Liter.

Die Keimung wird bis zur Sprossbildung auf einem Medium durchgeführt, das eine organische Stickstoffquelle enthält. Zur Förderung des Längenwachstums der Wurzeln werden die Embryonen dann auf ein weiteres Medium überführt, das aber keine organische Stickstoffquelle enthält.

Die Dichte der Embryonen in diesem Medium wird so begrenzt, dass sie geringer ist als die Dichte, die dafür sorgt, dass die Entwicklung selbsthemmend ist. Geeignete Dichten sind beispielsweise 1 bis 100 Embryonen in einer 9 cm Petrischale, die etwa 10 bis 75 ml, bevorzugt 25 bis 50 ml, insbesondere etwa 35 ml Medium enthält.

Das Medium bzw. die Medien von Schritt (e) werden bei 20° bis 30°C gehalten. Die Temperatur beträgt vorzugsweise etwa 25°C (Raumtemperatur).

In Schritt (e) wird im allgemeinen etwas Licht benötigt. Geeignete Lichtintensitäten liegen zwischen 5 und 150  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (= 417,5 bis 12525 lx), vorzugsweise zwischen 10 und 75  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (= 835 bis 6262,5 lx).

Bis zur Keimung werden die Embryonen auf dem Medium bzw. den Medien von Schritt (e) gehalten; typischerweise 1 bis 20 Tage, üblicherweise 2 bis 4 Tage. Für den Fachmann ist ein gekeimter Embryo leicht erkennbar.

#### Schritt f: Pflanzen

Nach der Keimung werden die Pflänzchen in Erde eingebracht und bis zur Reife weiterkultiviert. Die ausgepflanzten Pflänzchen werden anfangs mit Glas abgedeckt, um eine hohe Feuchtigkeit aufrechtzuerhalten. Nach etwa einer Woche unter Glas ist keine besondere Behandlung der Pflänzchen oder Pflanzen mehr nötig.

#### Brauchbarkeit - Vermehrung

Reife Embryonen können für Massenvermehrung und Klonierung verwendet werden. Dazu bedarf es der Keimung der Embryonen und des Auspflanzens der Pflänzchen in Erde, in andere Wachstums-substrate oder andere Wachstums-umgebungen. Reife Embryonen können auch von einem künstlichen Samenmantel umschlossen und als "somatische Samen" ausgesät werden. Massenvermehrung und Klonierung ist nutzbringend, wenn Hybrideltern oder ein Hybrid selbst in Massen produziert werden müssen.

Zellen, Proembryonen, Embryonen, Pflänzchen und Pflanzen können zu jeder Zeit während der oben beschriebenen Stadien analysiert werden, um zu bestimmen, ob irgendeine neue Eigenschaft als Folge genetischer Veränderungen vorhanden ist. Die Eigenschaft kann eine nützliche in vitro oder in planta Eigenschaft sein. Einige Beispiele von nützlichen Eigenschaften sind Phytotoxintoleranz, Trockentoleranz, Kältetoleranz, Krankheitstoleranz, etc.

Die aus den Schritten (a), (b) und (c) resultierenden Pflanzenzellen können auch in Gewebekulturverfahren eingesetzt werden, bei denen Pflanzen mit wünschenswerten Eigenschaften, wie beispielsweise Herbizidtoleranz, erzeugt werden sollen. Einige Beispiele solcher Verfahren sind beispielsweise in Chaleff und Ray (1984) beschrieben.

Die vorliegende Erfindung umfasst somit weiterhin lebende Baumwollpflanzen, deren Zellen das erfindungsgemäße chimäre Gen enthalten, welches ein Polypeptid kodiert und exprimiert, das im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften des Bt Kristallproteins besitzt.

Die erfindungsgemässen Pflanzenzellen enthalten das chimäre Gen und können zur Herstellung eines Polypeptids verwendet werden, das im wesentlichen die Insektentoxizität von Bt aufweist. Die Pflanzenzellen können per se das Insektizid darstellen. Bei den direkt als Insektizid genutzten Pflanzenzellen kann es sich um

kultivierte Pflanzenzellen oder um Bestandteile einer lebenden Pflanze handeln.

Das Toxin kann auch mit Hilfe bekannter Verfahren, wie beispielsweise durch Extraktion oder Chromatographie, direkt aus Pflanzenzellen isoliert werden. Der Extrakt kann der gesamte Pflanzenzellextrakt, ein teilweise gereinigter Extrakt oder eine reine Zubereitung des Polypeptids sein. Jeder auf diese Weise gewonnene Extrakt oder jedes chromatographische Isolat kann auf die gleiche Weise wie das kristalline Protein von *Bt* verwendet werden (siehe beispielsweise Deacon, 1983; Miller et al., 1983).

Die erfindungsgemässen insektiziden Zellen sind toxisch für Insekten, die Baumwollzellen und -pflanzen angreifen.

Somit stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, das im wesentlichen die Toxizitätseigenschaften eines *Bt* Kristallproteins aufweist, in Baumwollpflanzen bereit, das die folgenden Verfahrensmassnahmen umfasst:

- a) Einschleusung eines Gens in Baumwollzellen, das ein Polypeptid kodiert welches im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften eines *Bt* Kristallproteins aufweist, worin der Promotor, die 5'-nichttranslatierte Region und gegebenenfalls die 3'-nichttranslatierte Region des Gens von einem Pflanzengen oder einem Pflanzenvirusgen stammen und
- b) Expression des Polypeptids.

Die vorliegende Erfindung umfasst weiterhin eine Methode zur Kontrolle von Insektenlarven, die sich dadurch kennzeichnet, dass die Larven mit einer insektizid wirksamen Menge an transgenen Baumwollzellen gefüttert werden, die ein Gen enthalten, das ein kristallines *Bt* Toxin kodiert oder ein Polypeptid, welches im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften eines *Bt* Kristallproteins aufweist.

Ebenso ein Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Abtötung oder Kontrolle von Insektenlarven, das sich dadurch kennzeichnet, dass die Larven mit einer insektizid wirksamen Menge an transgenen Baumwollzellen gefüttert werden, die das erfindungsgemässe chimäre Gen enthalten.

Darüberhinaus umfasst die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Abtötung oder Kontrolle von Coleopteren-Larven, das sich dadurch kennzeichnet, dass die Larven mit einer insektizid wirksamen Menge der erfindungsgemässen, transgenen, insektiziden Baumwollzellen gefüttert werden, wobei die erfindungsgemässen, insektiziden Baumwollzellen das chimäre Gen, das das kristalline Toxin von *Bt* var. *tenebrionis* oder mindestens einen insektizid wirksamen Teil davon kodiert, exprimieren.

Die Pflanzenzellen können kultivierte Pflanzenzellen oder Bestandteile lebender Pflanzen sein.

Die vorliegende Erfindung umfasst weiterhin Baumwoll-Samen von erfindungsgemäss genetisch veränderten Pflanzen, sofern die Samen das eingefügte Gen und die daraus resultierende Eigenschaft enthalten. Die Nachkommen von Pflanzen, die mit Hilfe des erfindungsgemässen Verfahrens hergestellt werden, einschliesslich sexuell und vegetativ erzeugter Nachkommen, sind weitere Gegenstände dieser Erfindung. Sexuell erzeugte Nachkommenschaft kann aus Selbst- oder Fremdbestäubung resultieren.

#### Nichtlimitierende Ausführungsbeispiele

##### Allgemeine Verfahren der rekombinanten DNA-Technologie

Da viele der im Rahmen dieser Erfindung verwendeten Techniken für den Fachmann auf dem Gebiet der rekombinanten DNA-Technologie Routine sind, soll im Folgenden eine kurze zusammenfassende Beschreibung der gebräuchlichsten Verfahren gegeben werden, sodass diese in den nachfolgenden konkreten Ausführungsbeispielen nicht jedesmal wieder neu angegeben werden müssen.

Alle diese Routineverfahren sind bei Maniatis et al (1982) beschrieben, es sei denn, es wird gesondert darauf hingewiesen.

##### A. Schneiden mit Restriktionsendonukleasen

Typischerweise sind in dem Reaktionsansatz etwa 50 bis 500 µg/ml DNA in der vom Hersteller, New England Biolabs, Beverly, MA., empfohlenen Pufferlösung enthalten. 2 bis 5 Einheiten an Restriktionsendonukleasen werden für jedes µg DNA hinzugefügt und der Reaktionsansatz wird bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur für eine bis drei Stunden inkubiert. Die Reaktion wird durch 10 minütiges Erhitzen auf 65°C oder durch Extraktion mit Phenol beendet; es folgt eine Präzipitation der DNA mit Ethanol. Diese Technik wird auch auf den Seiten 104 bis 106 der Maniatis et al.-Referenz beschrieben.

##### B. Behandlung der DNA mit Polymerase zur Herstellung glatter Enden

DNA-Fragmente werden in dem vom Hersteller, New England Biolabs, empfohlenen Puffer in einer Konzentration von 50 bis 500 µg/ml zu einem Reaktionsansatz hinzugefügt. Der Reaktionsansatz enthält alle vier Desoxynukleotridtriphosphate in einer Konzentration von 0.2 mM. Die Reaktion erfolgt während 30 Minuten bei 15°C und wird anschliessend durch 10 minütiges Erhitzen auf 65°C beendet. Für Fragmente, die durch Schneiden mit Restriktionsendonukleasen erhalten werden, welche 5'-überstehende Enden erzeugen, wie EcoRI und BamHI, wird das grosse Fragment, oder Klenow-Fragment, der DNA-Polymerase verwendet. Für Fragmente, die durch Endonukleasen erhalten werden, welche 3'-überstehende Enden erzeugen, wie PstI und SacI, wird die T4-DNA-Polymerase verwendet. Die Verwendung dieser beiden Enzyme wird auf den Seiten 113 bis 121 der Maniatis et al.-Referenz beschrieben.

## C. Agarose-Gelelektrophorese und Reinigung von DNA-Fragmenten aus den Gelen

Die Agarose-Gelelektrophorese wird in einem horizontalen Apparat durchgeführt, wie auf den Seiten 150 bis 163 der Maniatis et al-Referenz beschrieben. Als Puffer wird der dort beschriebene Tris-Boratpuffer verwendet. Die DNA-Fragmente werden durch 0,5 µg/ml Ethidlumbromid gefärbt, das entweder im Gel- oder Tankpuffer bereits während der Elektrophorese vorhanden ist oder aber erst nach der Elektrophorese zugegeben wird. Die DNA wird durch Beleuchtung mit kurz- oder langwelligem Ultraviolettlicht sichtbar gemacht. Wenn die Fragmente nicht vom Gel abgetrennt werden sollen, wird eine Agarose verwendet, die bei niedriger Temperatur geliert und von Sigma Chemical, St. Louis, - Missouri, bezogen werden kann. Nach der Elektrophorese wird das gewünschte Fragment ausgeschnitten, in ein Plastikröhrchen gegeben, etwa 15 Minuten auf 65°C erhitzt, dreimal mit Phenol extrahiert und zweimal mit Ethanol gefällt. Dieses Verfahren ist gegenüber dem von Maniatis et al. auf Seite 170 beschriebenen leicht verändert.

## D. Anknüpfen synthetischer Linkerfragmente an DNA-Enden

Wenn eine neue Endonukleaseschnittstelle an das Ende eines DNA-Moleküls angefügt werden soll, wird das Molekül gegebenenfalls zuerst mit DNA-Polymerase behandelt, um glatte Enden zu erzeugen, wie in Abschnitt B beschrieben. Etwa 0,1 bis 1,0 µg dieses Fragments wird zu etwa 10 ng phosphorylierter Linker-DNA (New England Biolabs) zugegeben, die in einem Volumen von 20 µl bis 30 µl eines vom Hersteller empfohlenen Puffers vorliegt, zusammen mit 2 µl T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) und 1 mM ATP. Nach einer Inkubation über Nacht bei 15°C wird die Reaktion durch 10 minütiges Erhitzen auf 65°C beendet. Der Reaktionsansatz wird in einem für die Restriktionsendonuklease, welche die synthetische Linkersequenz schneidet, geeigneten Puffer auf etwa 100 µl verdünnt. Ungefähr 50 bis 200 Einheiten dieser Endonuklease werden zu diesem Ansatz hinzugefügt. Die Mischung wird 2 bis 6 Stunden bei der angemessenen Temperatur inkubiert, dann wird das Fragment einer Agarose-Gelelektrophorese unterworfen und wie in Abschnitt C beschrieben gereinigt. Das resultierende Fragment sollte nun Endigungen aufweisen, die normalerweise durch Schneiden mit der jeweiligen Restriktionsendonuklease erzeugt werden. Diese Enden sind gewöhnlich kohäsiv, so dass das resultierende Fragment nun leicht mit anderen Fragmenten, die die gleichen kohäsiven Enden aufweisen, verknüpft werden kann.

## E. Entfernen von 5'-terminalen Phosphaten von DNA-Fragmenten

Die Rezyklarisierung eines Vektors während der Plasmidklonierung kann durch die Behandlung des Vektorplasmids mit Phosphatase vermindert werden (diskutiert auf Seite 13 der Maniatis et al-Referenz). Nach der Verdauung der DNA mit der richtigen Restriktionsendonuklease wird eine Einheit alkalische Phosphatase aus dem Darm von Kälbern zugegeben, die von Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, bezogen werden kann. Die DNA wird eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal mit Phenol extrahiert und mit Ethanol gefällt.

## F. Verknüpfen der DNA-Fragmente

Wenn Fragmente mit komplementären kohäsiven Enden miteinander verknüpft werden sollen, werden etwa 100 ng von jedem Fragment in einem Reaktionsgemisch von 20 µl bis 40 µl mit etwa 0,2 Einheiten T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer inkubiert. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 1 bis 20 Stunden bei einer Temperatur von 15°C. Sollen DNA-Fragmente mit glatten Enden verknüpft werden, so werden diese in der zuvor angegebenen Weise inkubiert, wobei die Menge an T4 DNA-Ligase in diesem Fall auf 2 bis 4 Einheiten erhöht wird.

G. Transformation von DNA in *E. coli*

Der *E. coli* Stamm HB101 wird für die meisten Experimente verwendet. Die DNA wird dabei mit dem Kalziumchloridverfahren, das von Maniatis et al, auf den Seiten 250 bis 251, beschrieben wird, in *E. coli* eingeführt.

Transformierte Bakterien sind zu einem selektiven Wachstum auf Medien befähigt, die ein geeignetes Antibiotikum enthalten. Diese Fähigkeit zum selektiven Wachstum macht es möglich, die gewünschten Bakterien von denjenigen Wirtsbakterien zu unterscheiden, die keine transformierende DNA erhalten. Die Bestimmung geeigneter Antibiotika für die Selektion von Wirtsbakterien ist Routine und basiert auf der Kenntnis der Resistenzgene, die sich auf der eingeschleusten DNA befinden, sowie der Sensitivität der Wirtsbakterien gegenüber bestimmten Wirkstoffen. Falls z.B. bekannt ist, dass ein bestimmtes Wirtsbakterium gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin sensitiv und auf der eingeschleusten transformierenden DNA ein entsprechendes Resistenzgen gegen Ampicillin vorliegt, dann ist Ampicillin ein geeignetes Antibiotikum für die Selektion der Transformanten.

H. Screening von *E. coli* auf Plasmide

Nach der Transformation werden die resultierenden Kolonien von *E. coli* mit Hilfe eines schnellen Plasmidisolationsverfahren auf das Vorhandensein des gewünschten Plasmids geprüft. Zwei gebräuchliche Verfahren werden auf den Seiten 366 bis 369 der Maniatis et al-Referenz beschrieben.

## I. Isolierung von Plasmid-DNA in grossem Massstab

Verfahren zur Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* in grossem Massstab werden auf den Seiten 88 bis 94 der Maniatis et al-Referenz beschrieben.

## 5 J. Klonierung in M13 Phagenvektoren

Für die folgende Beschreibung gilt selbstverständlich, dass für Routineverfahren, wie Schneiden mit Restriktionsendonuklease, Verknüpfen etc., die doppelsträngige replikative Form der Phage M13-Abkömmlinge benutzt wird.

## 10 Beispiel 1: Konstruktion des chimären Gens im Plasmid pBR322

Um den CaMV GenVI-Promotor und die Protoxin-kodierende Sequenz miteinander zu verknüpfen, wird ein Abkömmling des Phagenvektors mp19 (Yanish-Perron et al., 1985) konstruiert.

Zuerst werden ein DNA-Fragment mit etwa 155 Nukleotiden 5' zur Protoxin-kodierenden Region und die angrenzenden etwa 1346 Nukleotide der kodierenden Sequenz in den Phagen mp19 eingespleisst. Die mp19 ds rf (doppelsträngige, replikative Form) Phagen-DNA wird mit den Restriktionsendonukleasen SacI und SmaI  
15 verdaut und das etwa 7.2 kbp (Kilobasenpaare) umfassende Vektorfragment wird nach der Elektrophorese über eine bei niedrigen Temperaturen gellierende Agarose mit Hilfe von Standardverfahren gereinigt. Das Plasmid pKU25/4, das etwa 10 kbp *Bt*-DNA einschliesslich des Protoxin-Gens enthält, wurde von Dr. J. Nüesch, Ciba-Geigy AG, Basel, Schweiz, erhalten. Die im Plasmid pKU25/4 vorhandene Nukleotidsequenz des  
20 Protoxin-Gens ist in Formel I abgebildet. Die pKU25/4 Plasmid-DNA wird mit den Endonukleasen HpaI und SacI verdaut, und ein 1503 bp Fragment (mit den Nukleotiden 2 bis 1505 der Formel I) wird wie zuvor beschrieben gereinigt (Dieses Fragment enthält etwa 155 bp der Bakterien-Promotorsequenzen und etwa 1346 bp vom Start der Protoxin-kodierenden Sequenz). Etwa 100 ng von jedem Fragment werden unter Zugabe von T4 DNA-Ligase vermischt, und über Nacht bei 15°C inkubiert. Mit dem resultierenden Gemisch  
25 wird der *E. coli* Stamm HB101 transformiert, mit den Indikatorbakterien *E. coli* JM101 vermischt und, wie bei Messing (1983) beschrieben, ausplattiert. Ein als mp19/bt bezeichneter Phage wird für die weitere Konstruktion verwendet. (vgl. Fig. 1)

Als nächstes wird ein DNA-Fragment mit dem CaMV GenVI-Promotor und einem Teil der das CaMV-GenVI kodierenden Sequenzen in den Phagen mp19/bt eingefügt. Die mp19/bt ds rf Phagen-DNA wird mit BamHI  
30 verdaut, zur Herstellung glatter Enden mit dem grossen Fragment der DNA-Polymerase behandelt, und anschliessend erneut mit der Endonuklease PstI geschnitten. Das grössere Vektorfragment wird wie oben beschrieben durch Elektrophorese gereinigt. Die Plasmid pABD1-DNA (Paszowski et al., 1984) wird mit PstI und HindIII verdaut. Das etwa 465 bp lange Fragment, das den CaMV GenVI-Promotor und etwa 75 bp der GenVI kodierenden Sequenz enthält, wird gereinigt. Die zwei Fragmente werden verknüpft und, wie zuvor  
35 beschrieben ausplattiert. Einer der resultierenden rekombinanten Phagen mit der Bezeichnung mp19/btca wird im folgenden Experiment verwendet.

Der Phage mp19/btca enthält CaMV GenVI-Promotorsequenzen, einen Teil der kodierenden Sequenz von GenVI, etwa 155 bp der *Bt*-DNA, stromaufwärts der Protoxin kodierenden Sequenz und etwa 1346 bp der Protoxin-kodierenden Sequenz. Um die CaMV Promotorsequenzen präzise mit den kodierenden Sequenzen  
40 für das Protoxin zu verbinden, wird die dazwischenliegende DNA durch Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese der mp19/btca-DNA deletiert. Ein DNA Oligonukleotid mit der Sequenz (5') TTCGGATTGTTATCCATGGTTGGAGGTCTGA (3') wird mit Hilfe von Routine verfahren unter Verwendung einer DNA-Synthese Apparatur ('Applied Biosystems DNA Synthesizer') synthetisiert. Dieses Oligonukleotid ist den Sequenzen der mp19/btcaPhagen-DNA am 3'-Ende des CaMV Promotors (Nukleotide 5762 bis 5778,  
45 Hohn et al., 1982) und dem Anfang der kodierenden Sequenz (Nukleotide 156 bis 172 in Formel I) komplementär.

Das allgemeine Verfahren für die Mutagenese wird von Zoller und Smith (1983) beschrieben. Etwa 5 µg einzelsträngige mp19/btcaPhagen-DNA wird mit 0.3 µg des phosphorylierten Oligonukleotids in einem Volumen von 40 µl vermischt. Das Gemisch wird 5 Minuten auf 65°C erhitzt, zunächst auf 50°C und  
50 anschliessend langsam weiter auf 4°C weiter abgekühlt. Als nächstes werden Puffer, Nukleotidtriphosphate, ATP, T4 DNA-Ligase und das grosse Fragment der DNA-Polymerase hinzugefügt und über Nacht bei 15°C, wie bei Zoller und Smith (1983) beschrieben, inkubiert. Nach der Gelelektrophorese in Agarose wird zirkuläre doppelsträngige DNA gereinigt und mittels Transfektion in den *E. coli* Stamm JM101 überführt. Die resultierenden Plaques werden auf das Vorhandensein von Sequenzen gescreent, die mit dem <sup>32</sup>P-markierten  
55 Oligonukleotid hybridisieren, und die Phagen werden mit Hilfe einer DNA-Restriktionsendonukleaseanalyse untersucht. Unter den resultierenden Phagenklonen befinden sich solche, bei denen die unerwünschten Sequenzen zwischen dem CaMV GenVI-Promotor und der kodierenden Sequenz für das Protoxin korrekt deletiert sind. Dieser Phage wird als mp19/btca/del bezeichnet (Fig. 2).

Als nächstes wird ein Plasmid konstruiert, in welchem die 3'-kodierende Region des Protoxin-Gens mit  
60 CaMV Transkriptionsterminationssignalen verbunden ist. Die im folgenden einzeln aufgeführten Verfahrensschritte sind in Fig. 3 wiedergegeben.

Zuerst wird die pABD1 Plasmid-DNA mit den Endonukleasen BamHI und BglII verdaut. Ein 0.5 kbp umfassendes Fragment mit den CaMV Transkriptionsterminationssequenzen wird isoliert. Anschliessend wird das Plasmid pUC19 (Yanish-Perron et al., 1985) mit BamHI verdaut, mit dem 0.5 kbp Fragment vermischt und  
65 mit T4 DNA-Ligase inkubiert. Nach der Transformation der DNA in den *E. coli* Stamm HB101 besitzt einer der

resultierenden Klone, mit der Bezeichnung p702 die in Fig. 3 gezeigte Struktur.

Als nächstes wird die p702 Plasmid-DNA mit den Endonukleasen SacI und SmaI geschnitten und das grössere, etwa 3.2 kbp umfassende Fragment durch Gelelektrophorese isoliert. Die pKU25/4 Plasmid-DNA wird mit den Endonukleasen AhaII und SacI verdaut und das 2.3 kbp Fragment (Nukleotide 1502 bis 3773 in Formel I) mit dem 3'-Teil der kodierenden Sequenz für das Protoxin (Nukleotide 1504 bis 3773 der in Formel I gezeigten Sequenz) nach Gelelektrophorese isoliert. Diese zwei DNA-Fragmente werden gemischt, mit T4 DNA-Ligase inkubiert und in den *E. coli* Stamm HB101 transformiert. Das resultierende Plasmid ist p702/bt (Fig. 3).

Zur Herstellung eines Plasmids, das die komplette kodierende Sequenz des Protoxins, flankiert von CaMV Promotor- und Terminatorsequenzen, enthält, werden schliesslich Teile der mp19/btca/del ds rf Phagen-DNA und des Plasmids p702/bt miteinander verknüpft.

Die mp19/btca/del Phagen-DNA wird mit den Endonukleasen SacI und SphI verdaut und ein Fragment von etwa 1.75 kbp wird nach Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Auf ähnliche Weise wird die p702/bt Plasmid-DNA mit den Endonukleasen SacI und Sall verdaut und ein Fragment von etwa 2.5 kbp isoliert. Schliesslich wird die pBR322 Plasmid-DNA (Bolivar et al., 1977) mit Sall und SphI verdaut und das grössere 4.2 kbp Fragment isoliert. Alle drei DNA-Fragmente werden gemischt, mit T4 DNA-Ligase inkubiert und damit der *E. coli* Stamm HB101 transformiert. Das resultierende Plasmid mit der Bezeichnung pBR322/btl4 ist ein Abkömmling von pBR322, das die CaMV GenVI-Promotor- und Translationsstartsignale enthält, verbunden mit der kodierenden Sequenz für das kristalline Protein von Bt, gefolgt von CaMV Transkriptionsterminationssignalen (Fig. 4).

#### Beispiel 2: Konstruktion eines vom Ti-Plasmid abgeleiteten Vektors

Beim Vektor pCIB10 (Rothstein et al., 1987) handelt es sich um einen vom Ti-Plasmid abgeleiteten Vektor, der für den Transfer chimärer Gene auf Pflanzen via *Agrobacterium tumefaciens* verwendet werden kann.

Der Vektor leitet sich von dem Plasmid pKR252 ab, das einen weiten Wirtsbereich aufweist und das von Dr. W. Barnes, Washington University, St. Louis, Mo. bezogen werden kann. Der Vektor enthält weiterhin ein Gen, welches eine Kanamycinresistenz in *Agrobacterium* vermittelt und aus dem Transposon Tn903 (Oka et al., 1981) stammt, sowie linke und rechte T-DNA Grenzsequenzen aus dem Ti-Plasmid pTIT37. Zwischen den Grenzsequenzen befinden sich eine Polylinkerregion aus dem Plasmid pUC18 und ein chimäres Gen, welches eine Kanamycinresistenz in Pflanzen hervorruft.

In einem ersten Verfahrensschritt wird das Plasmid pKR252 in der Weise modifiziert, dass das Tetracyclinresistenzgen gegen das Kanamycinresistenzgen aus dem Transposon Tn903 ausgetauscht wird.

Eine weitere Modifikation betrifft den Austausch der einzigen EcoRI Schnittstelle in pKR252 gegen eine BglII Schnittstelle (siehe Fig. 5, die einen zusammenfassenden Ueberblick über die oben angegebenen Modifikationen gibt).

Das Plasmid pKR252 wird zunächst mit den Endonucleasen Sall und SmaI verdaut und anschliessend mit der grossen Untereinheit der DNA Polymerase I behandelt, zur Herstellung glatter Enden. Das grosse Vektorfragment wird über eine Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

Als nächstes wird das Plasmid p368, das auf einem ca. 1050 Bp umfassenden BamHI Fragment Tn903 enthält, mit der Endonuklease BamHI verdaut und mit dem grossen Fragment der DNA Polymerase behandelt. Das etwa 1050 Bp umfassende Fragment wird dann nach Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Dieses Fragment enthält das Gen aus dem Transposon Tn903, das eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin vermittelt (Oka et al., 1981). Zur Erzeugung glatter Enden werden beide Fragmente mit der grossen Untereinheit der DNA-Polymerase behandelt. Anschliessend werden beide Fragmente vermischt und über Nacht bei einer Temperatur von 15°C mit T4 DNA-Ligase inkubiert. Nach der Transformation in den *E. coli*-stamm HB101 und einer Selektion Kanamycin-resistenter Kolonien erhält man das Plasmid pKR252/Tn903 (Fig. 5).

Das so erhaltene Plasmid pKR252/Tn903 wird an seiner einzigen EcoRI Schnittstelle geschnitten und anschliessend zur Herstellung glatter Enden mit der grossen Untereinheit der *E. coli* DNA-Polymerase behandelt. Dieses Fragment wird mit synthetischen Linkern, die BglII Restriktionsschnittstellen enthalten, vermischt und über Nacht mit T4 DNA-Ligase inkubiert. Die aus dieser Behandlung resultierende DNA wird mit einem Ueberschuss an BglII Restriktionsendonuklease verdaut und das grössere Vektorfragment mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Das resultierende Fragment wird erneut mit T4 DNA Ligase inkubiert, um das Fragment über seine neu hinzugefügten kohäsiven BglII Enden zu rezirkularisieren.

Nach Transformation in den *E. coli*-Stamm HB101 erhält man das Plasmid pKR252/Tn903/BglII (Fig. 5).

In einem weiteren Verfahrensschritt wird ein Derivat des Plasmids pBR322 konstruiert, das neben den T-DNA Grenzsequenzen aus dem Ti-Plasmid und der Polylinkerregion aus dem Plasmid pUC19 ein selektierbares Gen für Kanamycinresistenz in Pflanzen enthält (Fig. 6).

Das Plasmid pBR325/Eco29 enthält das 1.5 kbp umfassende EcoRI Fragment aus dem Nopalin Ti-Plasmid pTIT37. Dieses Fragment enthält die linken T-DNA Grenzsequenzen (Yadav et al., 1982). Für den Austausch der EcoRI Enden dieses Fragments mit HindIII Enden wird das Plasmid pBR325/Eco29 mit EcoRI verdaut und anschliessend mit Nuclease S1 inkubiert. Es folgt eine Inkubation mit dem grossen Fragment der DNA-Polymerase zur Herstellung glatter Enden. Dieser Ansatz wird dann mit synthetischen HindIII-Linkern vermischt und mit T4 DNA-Ligase inkubiert.

Die resultierende DNA wird mit den Endonukleasen ClaI und einem Ueberschuss an HindIII verdaut; das

resultierende 1.1 kbp umfassende Fragment, das die linke T-DNA Grenzsequenz enthält, wird mit Hilfe einer Gelelektrophorese gereinigt. Als nächstes wird die Polylinkerregion des Plasmids pUC19 isoliert, indem man die Plasmid DNA mit den Endonukleasen EcoRI und HindIII verdaut und das kleinere Fragment (annähernd 53 Bp) über eine Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Anschliessend wird das Plasmid pBR322 mit den

5 Endonukleasen EcoRI und ClaI verdaut, mit den beiden anderen, zuvor isolierten Fragmenten vermischt, mit T4 DNA-Ligase inkubiert und damit der *E. coli* Stamm HB101 transformiert. Das resultierende Plasmid pCIB5, enthält die Polylinkerregion und die linke T-DNA Grenzsequenz integriert in einen Abkömmling des Plasmids pBR322 (Fig. 6).

10 In einem weiteren Verfahrensschritt wird ein Plasmid konstruiert, das ein Gen enthält, welches die Expression einer Kanamycinresistenz in Pflanzen vermittelt (Fig. 7 und 8). Das Plasmid pBIN6 ist erhältlich bei Dr. M. Bevan, Plant Breeding Institute, Cambridge, UK. Dieses Plasmid wird ausserdem bei Bevan (1984) beschrieben.

Das Plasmid pBIN6 wird mit EcoRI und HindIII verdaut. Das etwa 1.5 kbp umfassende Fragment, welches das chimäre Neomycinphosphotransferase (NPT) Gen enthält, wird isoliert und anschliessend über eine

15 Agarosegelelektrophorese gereinigt. Dieses Fragment wird dann mit pUC18 Plasmid DNA vermischt, die zuvor mit den Endonukleasen EcoRI und HindIII geschnitten wurde.

Nach Inkubation mit T4 DNA-Ligase wird mit der resultierenden DNA der *E. coli* Stamm HB101 transformiert. Das entstehende Plasmid wird als pUC18/neo bezeichnet. Dieses Plasmid enthält eine unerwünschte BamHI Schnittstelle zwischen dem Neomycinphosphotransferase Gen und der Terminator Sequenz des Nopalinsyn-

20 thase Gens (siehe Bevan, 1984). Um diese Erkennungssequenz zu entfernen, wird das Plasmid pUC18/neo mit der Endonuklease BamHI verdaut, gefolgt von einer Behandlung mit der grossen Untereinheit der DNA-Polymerase zur Erzeugung glatter Enden. Um das Fragment zu rezirkularisieren, wird es anschliessend mit T4 DNA-Ligase inkubiert und damit der *E. coli* Stamm HB101 transformiert. Das resultierende Plasmid, pUC18/neo(Bam) besitzt keine BamHI Erkennungssequenz mehr.

25 In einem weiteren Verfahrensschritt wird die rechte T-DNA Grenzsequenz unmittelbar neben das chimäre NPT Gen inseriert (Fig. 8). Das Plasmid pBR325/Hind23 enthält das 3.4 kbp HindIII Fragment des Plasmids pTiT37. Dieses Fragment besitzt die rechte T-DNA Grenzsequenz (Bevan et al., 1983).

Das Plasmid pBR325/Hind23 wird mit den Endonukleasen SacII und HindIII geschnitten und ein 1.0 kbp umfassendes Fragment, welches die rechte Grenzsequenz enthält, im Anschluss an eine Agarosegelelektrophorese in gereinigter Form isoliert.

30 Das Plasmid pUC18/neo(Bam) wird mit den Endonukleasen SacII und HindIII verdaut und das 4.0 kbp umfassende Fragment mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese isoliert. Die beiden Fragmente werden miteinander vermischt, mit T4 DNA Ligase inkubiert und damit der *E. coli* Stamm HB101 transformiert. Das resultierende Plasmid, pCIB4 (Fig. 8) enthält die rechte T-DNA Grenzsequenz sowie einen in Pflanzen

35 selektierbaren Marker für Kanamycinresistenz in einem Abkömmling des Plasmids pUC18.

In einem letzten Verfahrensschritt wird ein Plasmid konstruiert, das sowohl die linke als auch die rechte T-DNA Grenzsequenz und zwischen diesen Grenzsequenzen das in Pflanzen selektierbare Kanamycinresistenzgen und den Polylinker des Plasmids pUC18 enthält.

40 Zunächst wird das Plasmid pCIB4 mit der Endonuklease HindIII verdaut, gefolgt von einer Behandlung mit der grossen Untereinheit der DNA Polymerase zur Herstellung glatter Enden sowie einer Verdauung mit der Endonuklease EcoRI. Das 2.6 kbp umfassende Fragment, welches das chimäre Kanamycinresistenzgen und die rechte T-DNA Grenzsequenz enthält, wird mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese isoliert.

Anschliessend wird das Plasmid pCIB5 mit der Endonuklease AatII verdaut, zur Erzeugung glatter Enden mit T4 DNA-Polymerase behandelt und dann mit der Endonuklease EcoRI geschnitten. Das grössere

45 Vektorfragment wird mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese gereinigt, mit dem pCIB4-Fragment vermischt, mit T4 DNA-Ligase inkubiert und damit der *E. coli* Stamm HB101 transformiert.

Das resultierende Plasmid pCIB2 (Fig. 9) ist ein Derivat des Plasmids pBR322, das die gewünschten Sequenzen zwischen den beiden T-DNA Grenzsequenzen enthält.

Die folgenden Schritte komplettieren die Konstruktion des Vektors pCIB10. Sie sind in Fig. 10 dargestellt.

50 Das Plasmid pCIB2 wird mit der Endonuklease EcoRV verdaut und, wie zuvor beschrieben, mit synthetischen Linkern, die eine BglII Erkennungsstelle besitzen, versehen. Nach einer Verdauung mit einem Ueberschuss an BglII, wird das annähernd 2.6 kbp umfassende Fragment mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese isoliert. Das zuvor bereits beschriebene Plasmid pK252/Tn903/BglII (Fig. 5), wird mit der Endonuklease BglII verdaut und anschliessend mit Phosphatase behandelt, um eine Rezirkularisierung zu verhindern. Diese beiden DNA

55 Fragmente werden dann miteinander vermischt, mit T4 DNA-Ligase inkubiert und anschliessend in den *E. coli* Stamm HB101 transformiert. Das resultierende Plasmid ist der vervollständigte Vektor pCIB10.

### Beispiel 3: Einbau des chimären Protoxingens in den Vektor pCIB10

Die im Folgenden beschriebenen Verfahrensschritte sind in Fig. 11 wiedergegeben.

60 Das Plasmid pBR322/btl4 wird mit den Endonukleasen PvuI und SalI geschnitten und anschliessend mit der Endonuklease BamHI partiell verdaut.

Ein ca. 4.2 kbp umfassendes BamHI-SalI Fragment, welches das chimäre Gen enthält, wird mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese isoliert und mit dem durch die Endonukleasen BamHI und SalI verdauten Plasmid pCIB10 vermischt. Nach einer Inkubation mit T4 DNA-Ligase und Transformation des *E. coli* Stamms HB101,

65 erhält man das Plasmid pCIB10/19Sbt (Fig. 11). Dieses Plasmid enthält das chimäre Protoxingen im

Plasmid-Vektor pCIB10.

Für den Transfer des Plasmids pCIB10/19Sbt von *E. coli* HB101 auf *Agrobacterium* wird ein intermediärer *E. coli*-Wirt verwendet und zwar der *E. coli* Stamm S17-1 (Simon et al, 1983). Dieser *E. coli* Stamm, der von Agrigenetics Research Co., Boulder, Co., bezogen werden kann, enthält Mobilisierungsfunktionen, die einen direkten Transfer des Plasmids pCIB10/19Sbt auf *Agrobacterium* via einer Konjugation erlauben. Damit kann die Notwendigkeit eines direkten Transfers nackter Plasmid DNA in *Agrobacterium* umgangen werden.

Zunächst wird pCIB10/19Sbt Plasmid DNA in Calciumchlorid behandelte S17-1 Zellen eingeschleust. Danach werden Kulturen transformierter S17-1 Zellen mit *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Ooms et al, 1982) vermischt und auf N Agar (Difco) Platten über Nacht bei Raumtemperatur gepaart.

Von den resultierenden Bakterien wird eine Probe entnommen und auf AB Minimalmedium, das 50 µg/ml Kanamycin enthält, überimpft (Chilton et al, 1974) und ausplattiert. Die Inkubation erfolgt bei 28°C. Die gewachsenen Kolonien werden auf demselben Medium ein zweites Mal ausgestrichen und dann auf N Agarplatten überimpft und ausplattiert. Langsam wachsende Kolonien werden herausgegriffen und auf einem AB Minimalmedium mit Kanamycin ausgestrichen und einzelne Kolonien isoliert. Nach diesem Verfahren werden Agrobakterien isoliert, die das Plasmid pCIB10/Sbt enthalten.

#### Beispiel 4: Transfer des chimären Gens auf Tabak-Zellen

Protoplasten von *Nicotiana tabacum* cv. "Coker 176" werden wie folgt hergestellt:

Vier bis fünf Wochen alte Sprosskulturen werden unter aseptischen Bedingungen in einem MS Medium (Murashige und Skoog, 1962) ohne Hormone bei einer Temperatur von 26°C und einer Photoperiode von 16 Stunden Licht/ 8 Stunden Dunkelheit, herangezogen. Ca. 1.5 g Blattgewebe werden von der Pflanze entnommen und gleichmässig auf 8 bis 10 Petrischalen (100 x 25 mm, Lab-Tek), die jeweils 10 ml einer Enzymlösung enthalten, verteilt. Die Enzymlösung enthält 1 % Cellulase R-10, (Yakult Pharmaceuticals Co.), 0,25 Macerase (Calbiochem Ca.), 1 % Pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceuticals Co.), 0,45 M Mannit und 0,1xK3 Salze (Nagy und Maliga, 1976).

Die Tabakblätter werden mit Hilfe eines Skalpells in dünne Streifen geschnitten. Die Petrischalen werden anschliessend verschlossen und auf einer Rundschrüttelmaschine bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 35 Upm und Raumtemperatur für einen Zeitraum von 4 bis 5 Stunden mit den Enzymen inkubiert.

Anschliessend wird der Inhalt der Petrischalen durch einen mit einem feinmaschigen Gewebe (Mull) ausgelegten Trichter filtriert und in einem Auffanggefäss gesammelt. Das Filtrat wird dann in "Babcock" Flaschen pipettiert, die jeweils 35 ml einer Waschlösung enthalten [Die Waschlösung enthält: 0,45 M Saccharose, MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure) sowie 0.1 x K3 Salze]. Die Flaschen werden 10 Minuten bei 80 g zentrifugiert, wodurch die Protoplasten an die Oberfläche der Flaschen flottieren. Die Protoplasten werden mit Hilfe einer 1 ml Pipette entnommen, in einer Flasche gesammelt und zwei weitere Male gewaschen. Die resultierenden Protoplasten werden in K3 Medium in einem 15 ml Einmalzentrifugenröhrchen suspendiert.

Die Konzentration der Protoplasten wird durch Auszählen in einem Fuchs-Rosenthal Hämocytometer bestimmt. Die Protoplasten werden dann in Petrischalen (100 x 20 mm, Corning), die 6 ml eines flüssigen K3 Mediums enthalten, in einer Dichte von 100 000/ml ausplattiert. Die Petrischalen mit den Protoplasten werden anschliessend für zwei Tage bei einer Temperatur von 26°C im Dunklen inkubiert. Während dieser Zeit erfolgt die Regeneration der Zellwand.

Nach Beendigung der zweitägigen Inkubation werden 5 µl einer stationären *A. tumefaciens* Kultur, die das Plasmid pCIB10/19Sbt enthalten, zu den Protoplasten hinzugegeben (Die Agrobakterien werden in einem YEP-Medium, das 50 µg/ml Kanamycin als Zusatz enthält, bei einer Temperatur von 28°C kultiviert bis die stationäre Phase erreicht ist).

Nach einer Inkubationszeit von drei weiteren Tagen bei 26°C, wird Cefotaxim (Calbiochem Co.) hinzugegeben, bis eine Endkonzentration von 500 µg/ml erreicht ist, um die Agrobakterien abzutöten.

Am darauffolgenden Tag werden die Zellen mit 3 ml frischem K3 Medium pro Petrischale verdünnt. Anschliessend wird erneut Cefotaxim bis zu einer Endkonzentration von 500 µg/ml zugegeben. Die Zellen werden dann bei einer Temperatur von 26°C für 3 bis 4 Wochen kultiviert und anschliessend auf Selektivmedien gescreent, wie bei DeBlock et al (1984) beschrieben.

#### Beispiel 5: Konstruktion eines chimären Gens für das Bt Protoxin mit dem CaMV 35S Promotor

##### 5.1 Konstruktion einer CaMV 35S Promotor-Kassette

Das Plasmid pCIB710 wird wie in Fig. 12 gezeigt konstruiert. Dieses Plasmid enthält CaMV Promotor- und Transkriptionsterminationssequenzen für das 35S RNA-Transkript (Covey et al., 1981). Ein 1149 Bp BgIII-Restriktionsfragment der CaMV-DNA (Bp 6494 bis 7643; Hohn et al., 1982) wird von dem Plasmid pLV111 (erhalten von Dr. S. Howell, Univ. Calif., San Diego) isoliert; alternativ dazu kann das Fragment durch präparative Agarose-Gelelektrophorese, wie zuvor beschrieben, direkt isoliert, mit BamHI-geschnittener pUC19 Plasmid-DNA vermischt, mit T4 DNA-Ligase behandelt und damit *E. coli* transformiert werden (Beachte, dass die BamHI-Restriktionsschnittstelle im resultierenden Plasmid durch Verknüpfen der BgIII kohäsiven Enden mit den BamHI kohäsiven Enden zerstört wird). Das resultierende Plasmid, genannt pUC19/35S, wird dann in einer Oligonukleotid-vermittelten *in vitro* Mutagenese dazu verwendet, um die BamHI-Erkennungssequenz GGATCC direkt im Anschluss an das CaMV Nukleotid 7483 der Hohn et al.-Referenz einzufügen. Das resultierende Plasmid pCIB710 enthält die CaMV 35S Promotor- und



Transkriptionsterminationsregion, getrennt durch eine BamHI-Restriktionsschnittstelle. In diese BamHI-Schnittstelle eingefügte DNA-Sequenzen werden in Pflanzen durch diese CaMV Transkriptions-Regulationssequenzen exprimiert (Beachte auch, dass pCIB710 keine ATG Translationsinitiationskodons zwischen dem Start der Transkription und der BamHI-Schnittstelle enthält).

#### 5.2. Einfügen der CaMV 35S Promotor/Terminatorkassette in pCIB10

Die folgenden Schritte sind in Fig. 13 dargestellt. Die pCIB10- und pCIB710 Plasmid-DNA wird mit EcoRI und Sall geschnitten, vermischt und verknüpft. Das resultierende Plasmid pCIB10/710 enthält die CaMV 35S Promotor-/Terminatorkassette, eingefügt in den Pflanzentransformationsvektor pCIB10. Die CaMV 35S-Sequenzen befinden sich zwischen den T-DNA-Grenzsequenzen in pCIB10 und werden so bei Pflanzentransformationsexperimenten in das pflanzliche Genom eingefügt.

#### 5.3. Einfügen des Bt Protoxin Gens in pCIB10/710

Die folgenden Schritte sind in Fig. 14 dargestellt. Als eine Quelle für das Protoxin-Gen wird das Plasmid pCIB10/19Sbt mit BamHI und NcoI geschnitten und das 3.6 kbp Fragment mit dem Protoxin-Gen durch präparative Gelelektrophorese isoliert. Das Fragment wird dann mit einem synthetischem NcoI-BamHI-Adapter, der die Sequenz 5'-CATGGCCGGATCCGGC-3' aufweist, vermischt und mit BamHI geschnitten. Dieser Schritt erzeugt BamHI kohäsive Enden an beiden Seiten des Protoxinfragments. Dieses Fragment wird dann in zuvor mit BamHI geschnittenes pCIB10/710 eingefügt. Das in Fig. 14 gezeigte resultierende Plasmid pCIB10/35Sbt enthält das Protoxin-Gen zwischen den CaMV 35S Promotor- und Transkriptionsterminationssequenzen.

#### 5.4. Transfer des Plasmids pCIB10/35Sbt in *Agrobacterium tumefaciens* für die Pflanzentransformation

Das Plasmid pCIB10/35Sbt wird in den *A. tumefaciens* Stamm LBA4404 transferiert, wie zuvor in Beispiel 4 beschrieben.

#### Beispiel 6: Konstruktion des Plasmids pTOX, das ein chimäres Gen enthält, welches das insektizide Toxinprotein von *Bt* var. *tenebrionis* kodiert.

Ein Gen, welches das insektizide Kristallprotein von *Bt* var. *tenebrionis* kodiert, wurde von Sekar et al. (1987) charakterisiert und sequenziert.

Diese kodierende Sequenz wird in Form eines gewöhnlichen Restriktionsfragments isoliert, wie z.B. einem HindIII Fragment von annähernd 3 kbp, und in einem geeigneten Pflanzen-Expressions-Vektor eingespleisst, wie etwa das Plasmid pCIB770 (Rothstein et al., 1987).

Das Plasmid pCIB770 enthält ein chimäres Kanamycingen, das in Pflanzen exprimiert wird, sowie den Promotor und Terminator des 35S RNA Transkripts von CaMV, die durch eine nur einmal im Plasmid vorliegende BamHI Restriktionsschnittstelle voneinander getrennt sind.

Das Restriktionsfragment, das die Toxin-kodierende Sequenz enthält, wird mit dieser einzigen BamHI Restriktionsschnittstelle des Plasmids pCIB770 mit Hilfe eines geeigneten molekularen Adapters kompatibel gemacht. Anschliessend werden die beiden Fragmente miteinander verknüpft.

#### Beispiel 7: Konstruktion des Plasmids pSAN, das ein chimäres Gen enthält, welches das insektizide Toxinprotein von *Bt* var. *san diego* kodiert

Ein Gen, welches das insektizide Protein von *Bt* var. *san diego* kodiert, wurde von Herrnschmidt et al. (EP-202,739 und EP-213,818) charakterisiert und sequenziert.

Diese kodierende Sequenz wird auf einem gewöhnlichen Restriktionsfragment isoliert und in einen geeigneten Pflanzen-Expressions-Vektor, wie das Plasmid pCIB770, eingespleisst.

Das Plasmid pCIB770 enthält ein chimäres Kanamycingen, das in Pflanzen exprimiert wird, sowie den Promotor und Terminator des 35S RNA Transkripts von CaMV, die durch eine nur einmal im Plasmid vorliegende BamHI Restriktionsschnittstelle voneinander getrennt sind.

Das Restriktionsfragment, das die Toxin-kodierende Sequenz enthält, wird mit dieser einzigen BamHI Restriktionsschnittstelle des Plasmids pCIB770 mit Hilfe eines geeigneten molekularen Adapters kompatibel gemacht. Anschliessend werden die beiden Fragmente miteinander verknüpft.

#### Beispiel 8: Konstruktion eines deletierten Bt Protoxin Gens, das ein Polypeptid mit etwa 725 Aminosäuren kodiert, sowie Konstruktion eines chimären Gens, welches das deletierte Gen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors enthält

Für die Herstellung eines deletierten Protoxin Gens, das ein Polypeptid mit ca. 725 Aminosäuren kodiert, wird der Teil des Gens, der den COOH-terminalen Anteil des Toxins kodiert, durch Schneiden an der KpnI Restriktionsschnittstelle an Position 2325 der in Formel I wiedergegebenen Sequenz entfernt.

Das Plasmid pCIB10/35Sbt (Fig. 14) wird mit BamHI und KpnI verdaut, und das etwa 2.2 kbp umfassende BamHI/KpnI Fragment, das das deletierte Protoxin Gen enthält, wird mit Hilfe einer präparativen Agarosegelelektrophorese isoliert. Um die KpnI Schnittstelle am 3' Ende in eine BamHI Schnittstelle umzuwandeln, wird das Fragment mit einem KpnI/BamHI Oligonukleotid-Adapter vermischt und verknüpft. Dieses Fragment wird dann mit dem BamHI-geschnittenen Plasmid pCIB10/710 (Fig. 13) vermischt.

Die resultierenden Transformanten, die mit pCIB10/35Sbt (KpnI) bezeichnet werden und in Fig. 15



wiedergegeben sind, enthalten das deletierte Protoxin Gen, das ein Polypeptid mit ca. 725 Aminosäuren kodiert. Diese Transformanten werden auf Kanamycin selektioniert.

Beispiel 9: Konstruktion eines deletierten *Bt* Protoxin Gens, das ein Polypeptid mit etwa 645 Aminosäuren kodiert, sowie Konstruktion eines chimären Gens, welches das deletierte Gen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors enthält

5

Für die Herstellung eines deletierten Protoxin Gens, das ein Polypeptid mit ca. 645 Aminosäuren kodiert, wird der Teil des Gens, der den COOH-terminalen Anteil des Toxins kodiert, durch Schneiden an der BclI Restriktionsschnittstelle an Position 2090 der in Formel I wiedergegebenen Sequenz entfernt.

Das Plasmid pCIB10/35Sbt (Fig. 14) wird mit BamHI und BclI verdaut und das ca. 1.9 kbp umfassende Fragment, welche das deletierte Toxingen enthält, wird mit Hilfe einer präparativen Agarosegelelektrophorese isoliert. Da BclI ein kohäsives Ende entstehen lässt, das mit BamHI kompatibel ist, müssen vor dem Einspleissen dieses Fragmentes in das BamHI-geschnittene Plasmid pCIB10/710 (Fig. 13) keine weiteren Manipulationen vorgenommen werden. Das resultierende Plasmid, das die Struktur des in Fig. 16 wiedergegebenen Plasmids pCIB10/35Sbt (BclI) aufweist, wird auf Kanamycin selektioniert.

15

Beispiel 10: Konstruktion eines deletierten *Bt* Protoxin Gens, das ein Polypeptid mit etwa 607 Aminosäuren kodiert, sowie Konstruktion eines chimären Gens, welches das deletierte Gen unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors enthält

Für die Herstellung eines deletierten Protoxin Gens wird eine BamHI Schnittstelle (GGATCC) unmittelbar im Anschluss an das Nukleotid 1976 der in Formel I wiedergegebenen Sequenz eingefügt.

20

Dabei wird zunächst das BamHI Fragment, welches die Protoxinsequenz enthält, von pCIB10/35Sbt in mp18 kloniert, unter Verwendung der zuvor im Rahmen der Oligonukleotid Mutagenese beschriebenen Standardverfahren

Nach Durchführung der Mutagenese wird doppelsträngige replikative DNA von dem M13 Klon gewonnen, die anschliessend mit BamHI verdaut wird. Das ca. 1.9 kbp umfassende Fragment, welches das deletierte Protoxin Gen enthält, wird dann in das BamHI-geschnittene Plasmid pCIB10/710 eingespleisst. Das resultierende Plasmid, das die Struktur des in Fig. 17 wiedergegebenen Plasmids pCIB10/35Sbt(607) aufweist, wird auf Kanamycin selektioniert.

25

Die weiteren Beispiele beschreiben spezifische Rezepte für die Transformation von Baumwollzellen sowie die Regeneration von Baumwollpflanzen aus Bauwollzellen und -kallus.

30

Es versteht sich von selbst, dass jeder Fachmann auf diesem Gebiet in der Lage ist, die nachstehend beschriebenen Rezepte in ihren Details zu verändern, ohne aber dadurch den erfindungsgemässen Umfang zu verlassen. So existieren beispielsweise eine ganze Reihe von bekannten Kulturmedien für pflanzliche Gewebe, von denen einige im Folgenden im Detail beschrieben werden. Ein Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet pflanzlicher Gewebekulturen weiss, in welcher Weise er diese Kulturlösungen variieren kann, um die gleichen oder aber ähnlichen Ergebnisse zu erhalten. So offenbart beispielsweise Ausführungsbeispiel 12 ein modifiziertes White's Basis-Medium für die Keimung von Samen und die Kallus-Entwicklung; Beispiel 13 beschreibt ein Murashige und Skoog's Basismedium für Wachstum und Erhaltung von Kallus; Beispiel 14 beschreibt ein Beasley und Ting Basismedium als Pflanzenkeimungsmedium. Der Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet der pflanzlichen Gewebekulturen weiss, wie er diese Basismedien variieren muss, um ähnliche Ergebnisse zu erhalten wie die, welche in den Beispielen beschrieben sind. So kann beispielsweise der Zucker im Kallus-Wachstumsmedium Glucose sein, der die phenolischen Sekretionen auf ein Minimum reduziert, oder aber Saccharose, das die Ausbildung eines embryogenen Kallus fördert.

35

40

Die für die Transformation verwendeten Explanate können aus jeder beliebigen geeigneten Quelle stammen, wie z.B. aus Sämlingen, vorzugsweise aus einem Hypocotyl oder einem Keimblatt, oder aber aus einem Embryo einer sich entwickelnden Frucht.

45

Für die Abtötung der nach der Transformation noch vorhandenen Agrobakterien kann jedes Antibiotikum verwendet werden, das toxisch ist für *Agrobacterium*. Besonders bevorzugt ist Cefatoxim.

50

Beispiel 11: Regeneration von Baumwollpflanzen

#### 11.1. Medien

Alle Medien enthalten die bei Murashige und Skoog genannten anorganischen Salze und die bei Gamborg genannten B-5-Vitamine; sie sind auf einen pH von 5,7 eingestellt und haben die folgende Zusammensetzung (mg/Liter):

55

60

65

Makronährstoffe		
5	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	KNO <sub>3</sub>	1900
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	440
Mikronährstoffe		
10	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
	MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	15.6
	ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	8.6
15	NaMoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.25
	CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0.025
	CaCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.025
	KI	0.83
	FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	27.8
20	Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
Vitamine		
25	Thiamin•HCl	10
	Pyridoxin•HCl	1
	Nicotinsäure	1
25	Myo-Inosit	100

Zusätzlich enthalten die verschiedenen Medien die folgenden Komponenten:

Medium	Zusätzliche Komponenten
30	1 20 g/Liter Saccharose, 0,6 % Agar Noble (Difco)
35	2 30 g/Liter Glucose, 2 mg/l α-Naphthalinessigsäure, 1 mg/Liter Kinetin, 0,8 % Agar Noble
40	3 30 g/Liter Saccharose, 2 mg/l α-Naphthalinessigsäure, 1 mg/Liter Kinetin, 0,8 % Agar Noble
45	4 20 g/Liter Saccharose, 0,5 mg/l Picloram
50	5 20 g/Liter Saccharose, 5 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
	6 20 g/Liter Saccharose, 15 mM Glutamin

55 Bei Medien, die bei 25°, 28° und 31°C eingesetzt werden, wird zusätzlich zur Temperatur auf eine Photoperiode von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit, bei einer Lichtintensität von 20 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (= 1670 lx), Bezug genommen.

#### 11.2: Samensterilisation und Auspflanzen

60 Samen von Baumwolle (*Gossypium hirsutum* var. Coker 310) werden entfasert, indem der Samen 2 Minuten in konzentrierte H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gelegt wird. Die Samen werden dann viermal mit sterilem, destilliertem Wasser gewaschen, in 95 % Ethanol getaucht, abgeflammt und auf Medium 1 bei 31°C gepflanzt.

65

**11.3: Kallusinduktion**

Sieben Tage nach dem Auspflanzen werden die Sämlinghypokotyle herausgeschnitten, längs aufgeschnitten, in 2 mm Abschnitte geschnitten und bei 31°C auf Medium 2 gelegt. Die Hypokotylabschnitte (2 mm) werden wöchentlich auf frisches Medium 2 übertragen, und diese Kulturen werden ebenfalls bei 31°C gehalten. Nach vier wöchentlichen Übertragungen auf Medium 2 wird Kallusgewebe, das an den Hypokotylabschnitten proliferiert, von dem ursprünglich verpflanzten Gewebe entfernt und bei einer Temperatur von 31°C kultiviert. Der Kallus wird nach einem Monat auf frisches Medium 3 übertragen und für weitere ein bis zwei Monate unterhalten.

**11.4: Initiierung der Suspensionskultur**

Zur Initiierung von Suspensionskulturen werden 100 mg Kallusgewebe in 35 ml Medium 4 in einem 125 ml DeLong Gefäß gegeben. Die Suspensionen werden 6 Wochen mit 140 upm (umdrehungen pro Minute) und 28°C geschüttelt. Während dieser Zeit beginnen sie, rasch zu proliferieren.

**11.5: Embryoentwicklung und Pflanzenregenerierung**

Die sich im Medium 4 entwickelnden Embryonen vermehren sich noch schneller, wenn Medium 4 durch Medium 5 ersetzt wird. Die embryogene Suspension wird geteilt und alle 3 bis 7 Tage in frischem Medium 5 weitere Male kultiviert. Zur Entwicklung der sich in Medium 5 vermehrenden Embryonen werden diese zunächst mit Medium 6 gewaschen und anschliessend in das gleiche Medium übertragen. Drei bis vier Wochen nach dem Transfer in Medium 6 werden die reifen Embryonen auf ein festes Medium bei 25°C gegeben. Das feste Medium besteht aus einem modifizierten MS-Medium, das die MS Salze, 40 mM KNO<sub>3</sub> an Stelle von KNO<sub>3</sub> und NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, B-5-Vitamine, 2 % Saccharose sowie 15 mM Glutamin enthält und das mit 0,2 % Gelrite verfestigt ist (pH 5,7). Die Embryonen werden in Petrischalen bei 25°C gegeben. Die Sprossentwicklung geschieht auf diesem Medium vereinzelt, und das Wurzellängenwachstum wird durch den Transfer der Embryonen auf das obige modifizierte MS-Medium ohne Glutamin verstärkt. Keimende Embryonen werden dann in Blähton in Tontöpfe gepflanzt und mit einem Becher bedeckt (25°C). Nachdem sich Pflänzchen im Blähton entwickelt haben, wird der Becher entfernt. Nach einer Woche bei 28°C werden die Pflänzchen in das Treibhaus in Erde gebracht, damit sie sich weiter zu ausgewachsenen Pflanzen entwickeln.

**Beispiel 12: Medien für die Samenkeimung und Kallusentwicklung**

[Zusammensetzung der modifizierten Stammlösung nach White (1961)]

Bestandteil	Konzentration pro 1000 ml.	Anmerkungen
MgSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O	3,6 g	Lösen der Bestandteile und Auffüllen auf ein Endvolumen von 1000 ml. Bezeichnung: Stammlösung White's A. Verwendung von 100 ml/Liter des fertigen Mediums.
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	1,65 g	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4 H <sub>2</sub> O	2,6 g	Lösen der Bestandteile und Auffüllen auf ein Endvolumen von 1000 ml. Bezeichnung: Stammlösung White's B. Verwendung von 100 ml/Liter des fertigen Mediums.
KNO <sub>3</sub>	800 mg	
KCl	650 mg	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	2,5 mg	Lösen der Bestandteile und Auffüllen auf ein Endvolumen von 1000 ml. Bezeichnung: Stammlösung White's C. Verwendung von 100 ml/Liter des fertigen Mediums.
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	2,5 mg	
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	300 mg	
ZnSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O	50 mg	
CuSO <sub>4</sub> •5 H <sub>2</sub> O	2,5 mg	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50 mg	
Fe-EDTA		Verwendung von 10 ml/Liter von MSFe/EDTA (siehe unten)
Organische Bestandteile		Verwendung von 10 ml/Liter von MS organisch (siehe unten)

**Beispiel 13: Medien für das Wachstum und die Aufrechterhaltung von Kallus**

[Zusammensetzung der Murashige und Skoog (1962) (MS) Stammlösung]

Beispiel 13: Medien für das Wachstum und die Aufrechterhaltung von Kallus

[Zusammensetzung der Murashige und Skoog (1962) (MS) Stammlösung]

Bestandteil	Konzentration pro 1000 ml.	Anmerkungen
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	41,26 g	Lösen der Bestandteile und Auffüllen auf ein Endvolumen von 1000 ml. <u>Bezeichnung:</u> <u>MS-Major</u> . Verwendung von 40 ml/Liter des fertigen Mediums.
KNO <sub>3</sub>	47,50 g	
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	11,00 g	
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	9,25 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,25 g	
KI	83 mg	Lösen der Bestandteile und Auffüllen auf ein Endvolumen von 1000 ml. <u>Bezeichnung:</u> <u>MS-Minor</u> . Verwendung von 100 ml/Liter des fertigen Mediums.
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620 mg	
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1690 mg	
ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	860 mg	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	25 mg	
CuSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2,5 mg	
CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	2,5 mg	
Nicotinsäure	50 mg	Lösen der Bestandteile und Auffüllen auf ein Endvolumen von 1000 ml. <u>Bezeichnung:</u> <u>MS-organisch</u> . Einfrieren von 10 ml Aliquots. Verwendung von 10 ml/Liter des fertigen Mediums.
Pyridoxin HCl	50 mg	
Thiamin HCl	10 mg	

Bestandteil	Konzentration pro 1000 ml.	Anmerkungen	
Fe EDTA	2,78 g	Lösen von 2.78 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5
Fe $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,73 g	in ca. 200 ml destilliertem	
Na <sub>2</sub> EDTA $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$		Wasser. Lösen von 3,73 g	
		Na <sub>2</sub> -EDTA $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Dinatriumsalz	10
		des Ethylendiaminotetraessig-	
		säuredihydrats) in 200 ml	
		destilliertem Wasser in einem	15
		separaten Gefäss. Erhitzen der	
		Na <sub>2</sub> -EDTA Lösung auf einer	
		Wärmpalte für ca. 10 Minuten.	
		Unter ständigem Rühren $\text{FeSO}_4$	20
		Lösung zur Na-EDTA Lösung	
		zugeben. Abkühlen der Lösung	
		auf Raumtemperatur und Auf-	
		füllen auf ein Endvolumen von	
		1000 ml. <u>Bezeichnung:</u>	
		MSFe-EDTA. Verschliessen des	25
		Aufbewahrungsgefässes mit Folie	
		und Aufbewahren im Kühlschrank.	
		Verwendung von 10 ml/Liter des	
		fertigen Mediums.	30
Thiamin HCl	50 mg	Lösen des Thiamins und	
		Auffüllen auf ein Volumen	
		von 500 ml. <u>Bezeichnung:</u>	35
		MS-Thiamin. Verwendung von	
		4.0 ml/Liter des fertigen	
		Mediums.	
m-Inosit	10 g	Lösen der Bestandteile und	40
Glycin	0,2 g	Auffüllen auf ein Endvolumen	
		von 1000 ml. <u>Bezeichnung:</u>	
		MS-Glycin/Inosit.	
		Verwendung von 10 ml/Liter des	45
		fertigen Mediums.	

50

Beispiel 14: Pflanzenkeimungsmedien

[Zusammensetzung einer Stammlösung nach Beasley und Ting (1973)]

55

60

65

	Bestandteil	Konzentration pro 1000 ml.	Anmerkungen
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2 H <sub>2</sub> O	2,72 g 61,83 mg 2,42 mg	Lösen der Bestandteile und Auffüllen auf ein Volumen von 100 ml. <u>Bezeichnung: B&amp;T-Stammlösung A.</u> Verwendung von 10 ml/Liter des fertigen Mediums.
10	CaCl <sub>2</sub> •2 H <sub>2</sub> O KI CoCl <sub>2</sub> •6 H <sub>2</sub> O	2,6 g 8,3 mg 0,24 mg	Lösen der Bestandteile und Auffüllen auf ein Volumen von 100 ml. <u>Bezeichnung: B&amp;T-Stammlösung B.</u> Verwendung von 10 ml/Liter des fertigen Mediums.
15	MgSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> •5 H <sub>2</sub> O	4,93 g 169,02 mg 86,27 mg 0,25 mg	Lösen der Bestandteile und Auffüllen auf ein Volumen von 100 ml. <u>Bezeichnung: B&amp;T-Stammlösung C.</u> Verwendung von 10 ml/Liter des fertigen Mediums.
20	KNO <sub>3</sub>  Nicotinsäure Pyridoxin HCl Thiamin HCl	25,275 g  4,92 mg 8,22 mg 13,49 mg	Lösen der Bestandteile und Auffüllen auf ein Volumen von 200 ml. <u>Bezeichnung: B&amp;T-Stammlösung D.</u> Verwendung von 40 ml/Liter des fertigen Mediums.  Lösen der Bestandteile und Auffüllen auf ein Endvolumen von 100 ml. <u>Bezeichnung: B&amp;T-organisch.</u> Verwendung von 10 ml/Liter des fertigen Mediums.
25	Fe-EDTA Inosit NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (15 µM)	   1200,6 mg/Liter des fertigen Mediums	Verwendung von 10 ml/Liter von MSFe/EDTA 100 mg/Liter des fertigen Mediums 1200,6 mg/Liter des fertigen Mediums

#### Beispiel 15: Regeneration ganzer Pflanzen ausgehend von Keimblatt-Explantaten

Baumwollsamens der Varietät Acala SJ2 von *Gossypium hirsutum* werden drei Minuten mit 95 % Alkohol sterilisiert, zweimal mit sterilem Wasser gewaschen, anschliessend für die Dauer von 15 Minuten in eine 15 %ige Natriumhypochlorit-Lösung eingebracht und erneut in sterilem Wasser gewaschen. Zur Herstellung von Keimlingen werden die so sterilisierten Samen für einen Zeitraum von etwa 14 Tagen im Dunklen auf einem der gebräuchlichen Agar-Medien zur Keimung gebracht. Die Keimblätter dieser Keimlinge werden in etwa 2 bis 4 mm<sup>2</sup> grosse Segmente zerschnitten und anschliessend unter sterilen Bedingungen auf ein Kallus-induzierendes Medium transferiert, das sich aus den Makro- und Mikrosalzen des Murashige und Skoog Medium (MS) zusammensetzt und zusätzlich Thiamin HCl [0,4 mg/Liter], Glucose [30 g/Liter], Naphthyl-1-essigsäure (NAA) 2 mg/Liter, Kinetin [1 mg/Liter], m-Inosit [100 mg/Liter] sowie Agar [0,8 %] enthält.

Die Kulturen werden bei etwa 30°C mit einer Photoperiode von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit in einem "Percival" Inkubator inkubiert. Die Beleuchtung erfolgt mit Hilfe von fluoreszierendem Licht (kaltes Tageslicht), bei einer Beleuchtungsstärke von etwa 2000 bis 4000 lx.

An den kultivierten Gewebefragmenten entwickeln sich innerhalb von drei bis vier Wochen Kalli, die eine weisse bis grau-grüne Färbung aufweisen. Die gebildeten Kalli werden alle drei bis vier Wochen auf ein Kallus-Wachstumsmedium überimpft, das m-Inosit [100 mg/Liter], Saccharose [20 g/Liter], Naphthyl-1-essigsäure [2 mg/Liter] und Agar enthält, und dort erneut kultiviert. Vier bis sechs Monate nach dem Transfer der Gewebeexplantate auf das Kallus-induzierende Medium erfolgt die Ausbildung somatischer Embryonen. Der Kallus und die Embryonen werden durch drei- bis vierwöchiges Ueberimpfen auf frisches Kallus-Wachstumsmedium und erneutes Kultivieren am Leben erhalten.

Somatische Embryonen, die sich an Gewebestücken entwickeln, werden entweder auf frisches Kallus-Wachstumsmedium überimpft oder aber auf ein spezifisches Keimungsmedium für Embryonen (Beasley & Ting's Medium) übertragen.

Die Pflänzchen, die sich aus den somatischen Embryonen entwickeln, werden auf ein Beasley and Ting's Medium transferiert, das als Zusatz Ammoniumnitrat [1200 mg/Liter] sowie Caseinhydrolysat [500 mg/Liter] als organische Stickstoffquelle enthält. Das Medium wird durch ein Verfestigungsmittel (Gelrit) stabilisiert und die Pflänzchen werden in "Magenta" Behälter plziert.

Die somatischen Embryonen entwickeln sich innerhalb von etwa drei Monaten zu Pflänzchen. Die Pflänzchen sind mit Erreichen des 6- bis 8-Blatt-Stadiums [die Grösse der Pflanzen beträgt dann zwischen 7,5 und 10 cm] bewurzelt und werden in Erde übertragen. Die Kultivierung erfolgt für einen Zeitraum von drei bis vier Wochen in einem Inkubator bei hoher Luftfeuchtigkeit. Danach werden die Pflänzchen ins Gewächshaus transferiert. Wenn die Pflänzchen ausgehärtet sind, werden sie in offene, bearbeitete Ackererde ausgepflanzt.

#### Beispiel 16: Regeneration von ganzen Pflanzen ausgehend von Keimblattexplantaten - Variation 1

Beispiel 15 wird wiederholt, wobei in diesem Fall ein halbkonzentriertes MS-Medium verwendet wird, in dem alle Medienbestandteile in ihrer angegebenen Konzentration auf die Hälfte reduziert sind. Man erhält im wesentlichen die gleichen Resultate wie bei Verwendung des voll-konzentrierten MS-Mediums.

Beispiel 17: Regeneration verschiedener Baumwoll-Varietäten ausgehend von Keimblattexplantaten

Die in den Beispielen 15 und 16 beschriebenen Verfahrensmassnahmen werden unter Verwendung der Acala Baumwoll-Varietäten SJ4, SJ2C-1, GC510, B1644, B2724, B1810, der "Picker" Varietät Siokra und der "Stripper" Varietät FC2017 durchgeführt. Alle zuvor aufgezählten Varietäten können erfolgreich regeneriert werden.

5

Beispiel 18: Regeneration von Baumwollpflanzen ausgehend von Keimblattexplantaten unter Zwischenschaltung einer Zell-Suspensionskultur.

Die in Beispiel 15 beschriebenen Verfahrensmassnahmen werden bis zur Herstellung eines Kallus, der zur Ausbildung somatischer Embryonen befähigt ist, wiederholt.

10

Stücke von 750 mg bis 1000 mg des aktiv wachsenden embryogenen Kallus werden in 8 ml Aliquots eines flüssigen Suspensionskultur-Mediums, das sich aus den Makro- und Mikro-Salzen des MS-Mediums zusammensetzt und darüberhinaus Thiamin HCl [0,4 mg/Liter], Saccharose [20 mg/Liter], m-Inositol [100 mg/Liter] und Naphthyl-1-essigsäure [2 mg/Liter] als Zusatz enthält, in "T"-Röhrchen suspendiert und anschliessend auf einer rotierenden Trommel bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 1,5 Upm und einem Licht/Dunkel Rhythmus von 16 Stunden/8 Stunden inkubiert. Das Licht stammt wiederum aus fluoreszierenden Lampen (kaltes Tageslicht) und hat eine Intensität zwischen 2000 und 4000 lx.

15

Nach vier Wochen wird die Suspensionskultur durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 840 µm filtriert, um grössere Zellklumpen zu entfernen. Die Fraktion, die nur Partikel mit einer Grösse von unter 840 µm umfasst, lässt man absetzen und wäscht anschliessend einmal mit 20 bis 25 ml eines frischen Suspensionskultur-Mediums. Diese Zellsuspension wird in "T"-Röhrchen überführt (2 ml pro Röhrchen) und jedes Röhrchen wird mit 6 ml frischem Suspensionskultur-Medium verdünnt. Die Kulturen werden durch Wiederholung der oben beschriebenen Verfahrensschritte in Intervallen von 10 bis 12 Tagen am Leben erhalten.

20

Bei jeder Wiederholung des zuvor beschriebenen Kultivierungsschrittes wird die Suspensionskultur erneut durch das 840 µm Netz filtriert und nur diejenige Fraktion, die Zellaggregate von weniger als 840 µm enthält, wird auf frisches Suspensionskultur-Medium überführt. In allen Fällen wird die Fraktion, die Zellklumpen von mehr als 840 µm aufweist, auf ein Kallus-Wachstumsmedium gegeben, um auf diese Weise somatische Embryonen zu erhalten.

25

Die somatischen Embryonen, die sich auf dem Kallus-Wachstumsmedium entwickeln, werden entfernt und auf ein Keimungsmedium für Embryonen übertragen. Unter Verwendung des in Beispiel 15 beschriebenen Versuchsprotokolls findet zunächst die Keimung der Embryonen statt, die sich dann zu Pflänzchen und anschliessend zu im Freiland wachsenden Pflanzen entwickeln.

30

Beispiel 19: Regeneration von Baumwollpflanzen ausgehend von Keimblattexplantaten unter Zwischenschaltung von Zell-Suspensions-Kulturen - Variante 1.

35

Die in Beispiel 18 beschriebenen Verfahrensschritte werden wiederholt, mit der Ausnahme, dass in diesem Fall die 750 bis 1000 mg embryogenen Kallusgewebes in eine DeLong Flasche übertragen werden, die 15 bis 20 ml eines flüssigen MS-Mediums mit 2 mg/Liter NAA enthält.

Die Flasche mit der Kultur wird auf einer Rundschüttelmaschine bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 100 bis 110 Upm inkubiert. Nach drei Wochen wird die Suspensionskultur durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 840 µm filtriert, um auf diese Weise grosse Zellklumpen für die Entwicklung ganzer Pflanzen zu gewinnen, wie in Beispiel 18 beschrieben.

40

Diejenige Fraktion, die Zellen mit einer Grösse von weniger als 840 µm aufweist, lässt man zunächst absetzen, wäscht diese anschliessend einmal in einem flüssigen MS-Medium und resuspendiert dann in 2 ml bis 5 ml eines flüssigen MS-Mediums.

45

Die Zellsuspension wird erneut kultiviert und zwar durch Übertragung von 1 ml bis 2 ml der Suspension in eine DeLong Flasche, die frisches MS-Medium enthält.

Die Kulturen werden durch Wiederholen der oben beschriebenen Verfahrensschritte in Intervallen von sieben bis zehn Tagen am Leben erhalten.

50

Für jede erneute Kultivierung werden lediglich diejenigen Suspensionen verwendet, die Zellen mit einer Grösse von weniger als 840 µm aufweisen. Die grösseren Zellklumpen (840 µm und grösser) werden für die Entwicklung ganzer Pflanzen verwendet.

Beispiel 20: Herstellung ganzer Pflanzen aus grossen Zellklumpen aus Suspensionskulturen

55

Nach drei- bis viermaliger Wiederholung der Kultivierung unter Verwendung der in den Beispielen 18 und 19 beschriebenen Versuchsprotokolle, werden 1,5 ml bis 2 ml der Zellsuspension von den "T"-Röhrchen bzw. den DeLong Flaschen entnommen und auf mit Agar verfestigtes MS-Medium übertragen, das 2 mg/Liter NAA enthält, sowie ein Beasley & Ting Medium, das mit 500 mg/Liter Caseinhydrolysat angereichert ist. Nach drei bis vier Wochen werden embryogene Kalli mit sich entwickelnden Embryonen sichtbar.

60

Auch in diesem Fall werden Zellklumpen mit 840 µm und mehr auf ein Kallus-Wachstumsmedium übertragen. Aus diesen Zellklumpen erhält man embryogene Klumpen mit sich entwickelnden Embryonen, die zuletzt zu ganzen Pflanzen heranwachsen.

65

Beispiel 21: Transformation von Baumwoll-Suspensionskulturzellen mit Hilfe von *Agrobacterium* LBA 443421.1. Wachstum der pflanzlichen Suspensionskultur

- 5 Eine Acala Baumwoll-Suspensionskultur (wie in Beispiel 18 beschrieben) wird in "T"-Röhrchen wiederholt kultiviert, wobei das Medium (MS-Medium mit 2 mg/Liter NAA) alle sieben bis zehn Tage gewechselt wird. Nach dem Mediumwechsel wird das "T"-Röhrchen jeweils um 90° gedreht, und man erlaubt den Zellen, sich abzusetzen. Vor der Transformation wird der Ueberstand mit Hilfe einer Pipette abgehoben und die resultierenden Zellen werden wie zuvor beschrieben behandelt.

21.2. Beschreibung des *Agrobacterium* Vektors

- 10 Der *Agrobacterium* Stamm LBA 4434 (Hoekema et al, 1983) enthält ein binäres, auf dem Ti-Plasmid basierendes Pflanzen-Transformationssystem. In einem solchen binären Transformationssystem enthält eines der Plasmide die T-DNA Region des Ti-Plasmids, während das zweite Plasmid die *vir*-Region des Ti-Plasmids aufweist. Die Transformation der Pflanze wird durch das Zusammenwirken beider Plasmide gewährleistet.
- 15 Im *Agrobacterium* Stamm LBA 4434 enthält das T-DNA Plasmid pAL1050 die  $T_L$  Sequenz von pTiAch5, einem Octopin-Ti-Plasmid. Das *vir*-Plasmid im Stamm LBA 4434, pAL4404, enthält dagegen die intakte Virulenzregion von pTiAch5 (Ooms et al, 1982). Der *Agrobacterium* Stamm 4434 kann von Dr. Robert Schilperoort, Abteilung für Biochemie, Universität Leiden, Niederlande, bezogen werden.

21.3 Kultivierung der Agrobakterien; Wachstumsbedingungen

- 20 Der transformierende *Agrobacterium* Stamm wird einer Glycerin-Stammlösung entnommen und in Form einer Uebernachtkultur kultiviert. Am nächsten Tag wird aus dieser Uebernachtkultur ein Aliquot entnommen und damit eine 50 ml-Kultur angeimpft. Die Agrobakterien werden auf YEB Medium kultiviert, das die folgende Zusammensetzung aufweist:

25 Rindfleischextrakt	5 g/Liter
Hefeextrakt	1 g/Liter
Pepton	5 g/Liter
30 Saccharose	5 g/Liter

Die Lösung wird mit Hilfe von NaOH auf einen pH von 7,2 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wird 1 ml einer 2 M  $MgCl_2$ -Lösung zugegeben.

- 35 Zu dem YEB Medium werden geeignete Antibiotika in einer geeigneten Konzentration zugegeben. Man bestimmt die optische Dichte der 50 ml Uebernachtkultur bei 600 nm ( $OD_{600}$ ), zentrifugiert die Kultur und resuspendiert das Pellet in einem Wachstumsmedium für Pflanzenzellen (MS-Medium plus NAA in einer Konzentration von 2 mg/ml) bis eine  $OD_{600}$  von 0,5 erreicht ist.

- 8 ml dieser bakteriellen Suspension wird zu jedem "T"-Röhrchen, das die pflanzlichen Zellen gemäss Abschnitt 21.1. enthält, zugegeben.

21.4. Infektion

- 40 Die "T"-Röhrchen mit den Pflanzen- und Bakterienzellen werden zunächst geschüttelt, um alle Zellen zu resuspendieren, und anschliessend erneut für einen Zeitraum von 3 Stunden auf einer rotierenden Trommel inkubiert, um den Agrobakterien die Möglichkeit zu geben, sich an die Pflanzenzellen anzuheften. Man lässt dann die Zellen absetzen und entfernt den restlichen Ueberstand.

- 45 Anschliessend wird ein Aliquot frisches Wachstumsmedium zu den "T"-Röhrchen zugegeben. Diese werden auf einer Schüttelvorrichtung für einen Zeitraum von 18 bis 20 Stunden in Gegenwart eventuell noch vorhandener Agrobakterien inkubiert. Danach lässt man die Zellen erneut absetzen, entfernt den Ueberstand und wäscht die Zellen zweimal mit einer Lösung aus Wachstumsmedium und Cefotaxim (200 µg/ml).

- 50 Nach dem Waschen werden die Zellen aus den einzelnen "T"-Röhrchen in jeweils 10 ml Wachstumsmedium mit Cefotaxim (jeweils 200 µg/ml) resuspendiert, und jeweils 1 ml Aliquots davon werden auf Petrischalen ausplattiert.

21.5. Kultivierung des transformierten Gewebes

- 55 Die mit Agrobakterien infizierten Zellen wachsen auf dem Wachstumsmedium, das keine Hormonzusätze enthält, und demonstrieren dadurch, dass das Gewebe das Wild-Typ Phytohormongen in Form einer T-DNA erhält.

- Die entsprechenden Zellen entwickeln sich zu Tumoren und bieten damit ein weiteres Indiz für die erfolgreiche Transformation der Kulturen.

60

Beispiel 22: Transformation von Baumwoll-Suspensionskulturzellen zu einem Kanamycin-resistenten, nicht-tumorösen Phänotyp

- Es werden die gleichen Verfahrensmassnahmen, die zuvor in Beispiel 21 beschrieben wurden, angewendet, abgesehen davon, dass andere transformierende Agrobakterien verwendet werden und dass das Pflanzen-Selektionsmedium ein Antibiotikum für die Selektionierung transformierter pflanzlicher Gewebe
- 65



enthält.

## 22.1. Kultivierung des pflanzlichen Gewebes

Die Kultivierung des pflanzlichen Gewebes erfolgt analog der in Beispiel 21, Abschnitt 21.1. angegebenen Verfahrensmassnahmen.

5

## 22.2. Beschreibung des *Agrobacterium*-Vektors

Die transformierenden *Agrobacterien* besitzen den T-DNA-enthaltenden binären Vektor pCIB10 (Rothstein et al, 1987) sowie das *vir*-Plasmid pAL4404. Die T-DNA von pCIB10 enthält ein chimäres Gen, das aus dem Promotor des Nopalinsynthasegens, der kodierenden Region von Tn5 (die das Enzym Neomycinphosphotransferase kodiert) und dem Terminator des Nopalinsynthasegens zusammengesetzt ist. Der *Agrobacterium* Stamm LBA4404, der das *vir*-Hefepiasmid pAL4404 (gemäss obiger Beschreibung) enthält, kann ebenfalls von Dr. R. Schilperoort bezogen werden.

10

## 22.3. Kultivierung der *Agrobacterien*, Wachstumsbedingungen

15

*Agrobacterien* mit dem Plasmid pCIB10 werden auf YEB Medium mit 50 µg/ml Kanamycin kultiviert. Die übrigen Kultivierungsbedingungen entsprechen denjenigen, die in Beispiel 21, Abschnitt 21.3. beschrieben sind.

## 22.4. Infektion

20

Die Transformation pflanzlicher Zellen erfolgt gemäss den in Beispiel 21 beschriebenen Verfahrensmassnahmen. In diesem Fall werden jedoch die aus Abschnitt 21.3 resultierenden Aliquots (1 ml) direkt auf mit selektiven Antibiotika angereicherten Medien ausplattiert.

Das Selektionsmedium enthält entweder Kanamycin (50 µg/ml) oder G418 (25 µg/ml). Die Expression des chimären *nos/neo/nos* Gens in transformiertem pflanzlichem Gewebe erlaubt die Selektion dieses Gewebes auf eines der zuvor genannten Antibiotika.

25

## 22.5. Kultivierung des transformierten Gewebes

In diesem und in allen folgenden Beispielen enthalten die Pflanzen-Wachstumsmedien Phytohormone gemäss den in Beispiel 15 gemachten Angaben.

30

Nach 2 bis 4 Wochen wird das transformierte Gewebe auf den Selektionsplatten sichtbar. Nicht-infiziertes sowie Kontrollgewebe zeigt keine Anzeichen von Wachstum. Es wird schliesslich braun und stirbt ab. Transformiertes Gewebe wächst dagegen auch in Gegenwart von Kanamycin und G418 sehr gut. Zu diesem Zeitpunkt werden gut wachsende Gewebestücke auf frisches Selektionsmedium überimpft und dort weiter kultiviert.

35

## 22.6. Kultivierung somatischer Embryonen

Aus den Gewebestücken bilden sich somatische Embryonen aus. Sie werden auf frisches Medium überimpft (nicht-selektives Medium).

40

## 22.7. Keimung

Wenn die Embryonen beginnen, auszudifferenzieren und zu keimen, d.h. zu dem Zeitpunkt, da sie mit der Bildung von Wurzeln beginnen und 2 bis 3 Blätter aufweisen, werden sie auf 'Magenta'-Behälter mit Wachstumsmedium übertragen. Die Pflänzchen werden noch bis zum 6 bis 8 Blattstadium weiterkultiviert, bevor sie von dem Agar-Medium entfernt werden.

45

## 22.8. Kultivierung der Pflänzchen

Die Pflänzchen werden jetzt in Topferde gepflanzt und zur Aufrechterhaltung einer hohen Luftfeuchtigkeit mit einem Becherglas abgedeckt und in einem "percival" Inkubator für 4 bis 8 Wochen kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wird das Becherglas entfernt und die Pflanzen werden ins Gewächshaus gebracht.

50

## 22.9. Kultivierung der Pflanzen im Gewächshaus

Die Pflanzen wachsen im Gewächshaus heran, entwickeln Blüten und bilden schliesslich Samen.

## Beispiel 23: Transformation von Zellen aus einer Baumwoll Suspensionskultur zu einem Glyphosate-toleranten Phänotyp

55

Sofern im folgenden keine anderslautenden Angaben gemacht werden, erfolgt die Durchführung der Experimente gemäss den Angaben in Beispiel 22.

Im Unterschied zu Beispiel 22 werden in diesem Fall andere transformierende *Agrobakterien* verwendet. Darüberhinaus wird nach der Selektion des pflanzlichen Gewebes auf einem für die Selektion von transformiertem pflanzlichem Material geeigneten Antibiotikum-haltigen Medium erneut selektioniert, diesmal auf Herbizid-Toleranz.

60

65

### 23.1. Beschreibung des *Agrobacterium*-Vektors

Die transformierenden *Agrobacterien* enthalten den T-DNA Vektor pPMG85/587 (Fillatti et al, 1987) sowie das vir-Plasmid pAL4404. Das Plasmid pPMG85/587 enthält drei chimäre Gene, die zu einer Expression in Pflanzen in der Lage sind. Zwei dieser Gene kodieren Neomycinphosphotransferase (NPT), ein Enzym, das eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin bzw. G418 verleiht. Das dritte chimäre Gen, welches die kodierende Sequenz eines mutierten *aroA* Gens aus *Salmonella typhimurium* besitzt, verleiht eine Toleranz gegenüber dem Herbizid Glyphosate (Comal et al, 1983).

### 23.2. Kultivierung des pflanzlichen Gewebes

Die Kultivierung des pflanzlichen Gewebes erfolgt analog der in Beispiel 21, Abschnitt 21.1. angegebenen Verfahrensmassnahmen.

### 23.3. Kultivierung der *Agrobakterien*

Die *Agrobakterien* mit dem T-DNA Vektor pPMG85/587 werden auf Kanamycinhaltigen Kulturmedien (100 µg/ml) herangezogen.

### 23.4. Infektion

Die Transformation wird gemäss den in Beispiel 21 im Einzelnen ausgeführten Verfahrensschritten durchgeführt. In diesem Fall werden jedoch die in Abschnitt 21.3. resultierenden Aliquots (je 1 ml) direkt auf die Medien mit den selektiven Antibiotika ausplattiert.

Diese Selektionsmedien enthalten entweder Kanamycin (50 µg/ml) oder G418 (25 µg/ml). Die Expression des chimären NPT Gens im pflanzlichen Gewebe erlaubt die Selektion des transformierten Pflanzengewebes auf einem dieser beiden Medien.

### 23.5. Kultivierung des transformierten Gewebes

Nach 2 bis 4 Wochen wird das transformierte Gewebe auf den Selektionsplatten sichtbar. Die Selektion des pflanzlichen Materials erfolgt in der Regel auf Kanamycin-haltigen Medien.

Das Pflanzengewebe (entweder einzelne Embryonen oder Kallus) wird anschliessend auf Medien überführt, die das Herbizid Glyphosate als Zusatz enthalten. Das transformierte Gewebe zeigt weiterhin gutes Wachstum.

### Beispiel 24: Transformation von Zellen aus einer Baumwoll Suspensionskultur zu einem Hygromycin-resistenten, nicht-tumörösen Phänotyp

Sofern im folgenden keine anderslautenden Angaben gemacht werden, erfolgt die Durchführung der Experimente gemäss den Angaben in Beispiel 22.

Im Unterschied zu Beispiel 22 werden in diesem Fall andere transformierende *Agrobakterien* verwendet. Darüberhinaus enthält das Pflanzenselektionsmedium ein Antibiotikum, das für die Selektion von transformiertem pflanzlichem Gewebe geeignet ist.

### 24.1. Kultivierung des pflanzlichen Gewebes

Die Kultivierung des pflanzlichen Gewebes erfolgt analog der in Beispiel 21, Abschnitt 21.1. angegebenen Verfahrensmassnahmen.

### 24.2. Beschreibung des *Agrobacterium*-Vektors

Die transformierenden *Agrobakterien* enthalten den binären T-DNA Vektor pCIB2115 (Rothstein et al, 1987) sowie das vir-Plasmid. Die T-DNA von pCIB2115 enthält ein chimäres Gen, das aus dem Promotor und dem Terminator des 35S Transkripts von CaMV (Odell et al, 1985) sowie der kodierenden Sequenz der Hygromycinphosphotransferase (Gritz und Davies, 1983) zusammengesetzt ist.

### 24.3. Kultivierung der *Agrobakterien*

Die *Agrobakterien*, welche das Plasmid pCIB2115 enthalten, werden auf YEB Medium, das 50 µg/ml Kanamycin enthält, kultiviert.

### 24.4. Infektion

Die Transformation wird gemäss den in Beispiel 21 im Einzelnen ausgeführten Verfahrensschritten durchgeführt. In diesem Fall werden jedoch die in Abschnitt 21.3 resultierenden Aliquots (je 1 ml) direkt auf die Medien mit den selektiven Antibiotika ausplattiert.

Das Selektionsmedium enthält 50 µg/ml Hygromycin. Die Expression des chimären Hygromycin Gens in transformiertem pflanzlichem Gewebe erlaubt die Selektion dieses Gewebes auf Hygromycin-haltigen Medien.

### 24.5.: Kultivierung des transformierten Gewebes

Die Kultivierung erfolgt analog der in Beispiel 22.5 beschriebenen Verfahrensmassnahmen. Das in dem Pflanzen-Selektionsmedium verwendete Antibiotikum ist in diesem Fall Hygromycin.

Beispiel 25: Pflanzenextraktionsverfahren

Das pflanzliche Gewebe wird in einem Extraktionspuffer homogenisiert (ca. 100 mg Gewebe in 0,1 ml Extraktionspuffer)

<u>Extraktionspuffer für Blattgewebe</u>		5
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (pH 9,5)	50 mM	
EDTA	10 mM	
Triton X-100	0,05 %	10
Tween	0,05 %	
NaCl	100 mM	
PMSF (erst kurz vor Gebrauch zugeben)	1 mM	
Leupeptin (erst kurz vor Gebrauch zugeben)	1 mM	15

Nach der Extraktion wird der pH-Wert des Extraktes durch Zugabe von 2 M Tris-Puffer auf einen Wert von pH 8,0 bis 8,5 eingestellt. Der Extrakt wird dann 10 Minuten in einer Beckman Mikrozentrifuge zentrifugiert und der so gewonnene Ueberstand für die ELISA Analyse verwendet. 20

Beispiel 26: ELISA Analyse des Pflanzenextraktes

ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") ist ein sehr sensibler und spezifischer Assay für antigenwirksames Material. Die ELISA Assays sind für den Nachweis der Expression von Polypeptid-Genprodukten sehr gut geeignet. 25

Die Entwicklung des ELISA Assays als generellem Hilfsmittel ist bei Clark et al (1986) beschrieben. Diese Beschreibung ist in Form einer Referenz ein Bestandteil dieser Erfindung.

Ein ELISA-Assay für das BtToxin wird unter Verwendung von Standardverfahren entwickelt und wird für die Analyse von transgenem Pflanzenmaterial auf die Expression von Bt Sequenzen benützt. Dabei werden die folgenden Verfahrensschritte angewendet: 30

Medien und Puffer

<u>EPBS ("ELISA Phosphate Buffered Saline")</u>			35
10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,68 g/4 Liter	
NaPhosphat:	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0,976 g/4 Liter	
140 mM NaCl	NaCl	32,7 g/4 Liter	40
pH ca. 7,4			

Borat-gepufferte Salzlösung

100 mM Borsäure	45
25 mM Na-Borat	
75 mM NaCl	

Einstellen des pH-Wertes auf 8,4 bis 8,5 mit HCl oder NaOH, je nach Bedarf.

ELISA Blockadepuffer

In EPBS:	50
1 % BSA ("Bovine Serum Albumine")	
0,02 % Na-Azid	

ELISA Waschpuffer

10 mM Tris-HCl; pH 8,0	55
0,05 % Tween 20	
0,02 % Na-Azid	

2,5 M TRIS

<u>ELISA Verdünner</u>	60
In EPBS:	
0,05 % Tween 20	
1 % BSA	65

0,02 % Na-Azid

#### ELISA Substratpuffer

- 5 In 500 ml:  
48 ml Diethanolamin,  
24,5 mg  $MgCl_2$ ;  
Einstellen des pH Wertes auf 9,8 mit HCl.

- 10 ELISA Substrat  
15 mg p-Nitrophenylphosphat in 25 ml ELISA Substratpuffer

#### Verfahren

- 15 1. Eine ELISA-Platte wird mit Ethanol vorbehandelt.  
2. Ein über eine Affinitätschromatographie gereinigtes Kaninchen-anti-*Bt*-Toxin Antiserum (50  $\mu$ l) wird in einer Konzentration von 3  $\mu$ g/ml in einer Borat-gepufferten Salzlösung auf die Platte gegeben und über Nacht bei einer Temperatur von 4°C inkubiert. Das Antiserum wird als Antwort auf die Immunisierung von Kaninchen mit über einen Gradienten gereinigten *Bt* Toxinkristallen (Ang und Nickerson, 1978), die mit Natriumdodecylsulfat solubilisiert werden, gebildet.
- 20 3. Waschen mit ELISA Waschpuffer.  
4. Behandlung der Platte mit Blockadepuffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur.  
5. Waschen mit ELISA Waschpuffer.  
6. Hinzufügen des Pflanzenextraktes in einer Menge, die einer Proteinmenge von 50  $\mu$ g entspricht (dies entspricht typischerweise ca. 5  $\mu$ l Pflanzenextrakt). Die Zusammensetzung des Blattextraktionspuffers ist in Beispiel 25 beschrieben. Der Proteinanteil wird mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt (Bradford, 1976), unter Verwendung einer kommerziell erhältlichen Testpackung (Bio-Rad, Richmond, Kalifornien). Sofern eine Verdünnung des Blattextraktes notwendig ist, verwendet man einen ELISA Verdünnner. Dieser Ansatz wird über Nacht bei 4°C inkubiert.
- 25 7. Waschen mit ELISA Waschpuffer.  
8. Zugabe von 50  $\mu$ l eines über eine Affinitätschromatographie gereinigten Ziegen-anti-*Bt*-Toxin Antiserums, in einer Konzentration von 3  $\mu$ g Protein/ml in ELISA Verdünnner. Inkubation für eine Stunde bei einer Temperatur von 37°C.  
9. Waschen mit ELISA Waschpuffer.
- 30 10. Zugabe von 50  $\mu$ l Kaninchen-anti-Ziegen-Antikörpern gebunden an alkalische Phosphatase (kommerziell erhältlich von Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.). Dieser Ansatz wird im Verhältnis 1:500 in ELISA Verdünnner verdünnt. Inkubation für eine Stunde bei 37°C.  
11. Waschen mit ELISA Waschpuffer.  
12. Zugabe von 50  $\mu$ l Substrat (0,6 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in ELISA Substratpuffer). 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- 35 13. Beenden der Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ l 3 M NaOH.  
14. Messen der Absorption bei 405 nm in einem modifizierten "ELISA-Reader" (Hewlett Packard, Stanford, Ca.).
- 40 Pflanzliches Gewebe, das mit dem pCIB10/35Sbt(Bcll) Konstrukt (Fig. 16) transformiert ist, zeigt bei der Analyse unter Verwendung des ELISA Assays eine positive Reaktion, was auf eine Expression des *Bt* Gens hinweist.
- 45

#### Beispiel 27: Bioassay transformierter Baumwolle

- 50 Eier von *Heliothis virescens* werden vom "Tobacco Insect Control Laboratory at North Carolina State University, Raleigh, North Carolina" bezogen.  
Die Eier befinden sich auf einer Mullunterlage, die in grosse gedeckte Bechergläser überführt wird. Das Becherglas ist mit feuchtem Filterpapier ausgekleidet, um eine gleichbleibende Feuchtigkeit zu garantieren. Die Inkubation der *Heliothis*-Eier erfolgt bei einer Temperatur von 29°C.  
Unter diesen Bedingungen schlüpfen die Larven innerhalb von drei Tagen. Nach dem Schlüpfen werden die Larven sobald wie möglich in kleine gedeckte Plastikbehälter überführt (1 Larve/Behälter), die jeweils eine Baumwollblattscheibe enthalten.
- 55 Die Uebertragung der Larven erfolgt mit Hilfe eines feinborstigen Pinsels.  
Die Blattscheiben, die einen Durchmesser von einem Zentimeter aufweisen, werden zuvor aus den Blättern von Baumwollpflanzen ausgestanzt und in dem Plastikbehälter auf ein rundes angefeuchtetes Filterpapier aufgebracht. Von jeder Pflanze werden mindestens 6 bis 8 Blattscheiben, die sowohl von jungen als auch von alten Blättern stammen, getestet. Die Blattscheiben werden in 2 Tagesintervallen oder aber in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme nach Bedarf ersetzt.
- 60 Die Wachstumsraten (die Grösse oder das Gesamtgewicht aller innerhalb einer Versuchsgruppe befindlichen Larven) sowie die Sterblichkeitsrate der Larven, die sich von Blättern transformierter Pflanzen ernähren, werden mit denjenigen der Kontrolltiere, die sich von nichttransformierten Baumwollblättern
- 65

ernähren, verglichen.

Larven, die sich von Blattscheiben ernähren, die von Baumwollpflanzen stammen, welche mit pCIB10/35Sbt(BclI) transformiert sind, zeigen eine verminderte Wachstumsrate sowie eine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zu den Kontrollen.

#### Beispiel 28: Konstruktion des Plasmids pCIB1300, das zu hohen Expressionsraten in Pflanzen führt

Zur Erzielung hoher Expressionsraten des *Bt* Toxins in Pflanzen wird das Plasmid pCIB1300 konstruiert. Dieses Plasmid enthält eine nicht-translatierte Leader-Sequenz 5' zu dem *Bt* Toxin, die zu einer Steigerung der *Bt* Toxin-Genexpression führt.

Bei der nicht translatierten Leader-Sequenz handelt es sich um eine 40 Bp umfassende Sequenz, die 5' zum Initiationskodon des *Bt* Toxins und 3' zum nicht-translatierten CaMV Leader liegt.

Das endgültige pCIB1300 Plasmid wird konstruiert, indem die 40 Bp umfassende Leader-Sequenz und ein deletiertes *Bt* Toxin in die BamHI Restriktionsschnittstelle des Plasmids pCIB10/710 eingespleisst werden, wie dies in Fig. 19 gezeigt wird.

Ein 1.9 kbp NcoI-BamHI Fragment des Plasmids pCIB20/35Sbt(Bcl) wird mit Hilfe einer bei niedrigen Temperaturen gelierenden Agarose gereinigt.

Die 40 Bp Leader Sequenz wird auf chemischem Wege mit Hilfe eines "applied Biosystems DNA Synthesizer" synthetisiert und zwar in Form eines doppelsträngigen Oligonukleotids mit einer überhängenden BamHI Schnittstelle am 5' Ende und einer überhängenden NcoI-Schnittstelle am 3' Ende. Die Sequenz der nicht-translatierten Leadersequenz, die in der Mitte der Fig. 19 wiedergegeben ist, leitet sich vom nicht-translatierten Leader des Hüllproteins des Alfalfa Mosaik Virus (AMV) ab, der bei Koper-Zwarthoff et al. (1977) beschrieben ist.

Der 40 Bp Leader, ein 1.9 kbp *Bt* Fragment, sowie der mit BamHI linearisierte pCIB710 Vektor werden unter Verwendung von T4 DNA-Ligase miteinander verknüpft ("three-part ligation"), wobei der Vektor pCIB1300 entsteht.

#### Beispiel 29: Isolierung eines cDNA Klon, der die kleine Untereinheit der RuBPCase in Baumwolle kodiert

*Gossypium hirsutum* (Funk line RF522) Pflanzen werden im Gewächshaus bei einer täglichen Lichtperiode von 14 Stunden aus Samen herangezogen. Aus jungen grünen Blättern wird anschliessend die RNA gemäss dem bei Newbury und Possingham (1977) beschriebenen Verfahren isoliert. Die Reinigung der PolyA<sup>+</sup> RNA ist bei Maniatis et al. (1982) auf Seite 197 beschrieben.

Doppelsträngige cDNA (komplementäre DNA) wird gemäss dem Verfahren von Okayama und Berg (1982) synthetisiert, wobei die folgenden Modifikationen durchgeführt werden:

- a) die Erststrang cDNA wird mit einem oligo-dT Starter versehen,
- b) nach dem Anfügen von oligo-dG Schwänzen an die doppelsträngige cDNA unter Verwendung von Polynukleotidyltransferase wird sie in das Plasmid pUC9 (PstI Schnittstelle, von Pharmacia) kloniert, das zuvor mit oligo-dC Anhängen versehen wurde, und über die komplementären Basen verknüpft, und
- c) mit der resultierenden DNA wird *E. coli* Stamm HB101 transformiert.

Da RuBPCase (Ribulosebiphosphatcarboxylase) zusammen mit dem Chlorophyll a/b Bindungsprotein (Cab) zu den Proteinen gehört, die am häufigsten in grünen Blättern vorkommen, wird die Genbibliothek auf die cDNA Klone der am häufigsten vorliegenden mRNA hin untersucht.

Die auf Nitrocellulosefiltern vorliegenden Abdrücke der cDNA Klone werden mit dem ersten cDNA Strang gescreent, der mit Hilfe von dCT<sup>32</sup>P und reverser Transkriptase radioaktiv markiert wird, wobei die gleiche polyA<sup>+</sup> RNA als Vorlage ("Template") dient, die auch zuvor bereits für die Konstruktion der cDNA Bibliothek verwendet wurde.

Auf diese Weise werden 6 von insgesamt 275 Klonen selektioniert und anschliessend weiter analysiert.

Die Northern-Analyse, die gemäss der bei Maniatis et al. (1982) auf Seite 202 gemachten Beschreibung durchgeführt wird, zeigt, dass zwei dieser cDNA Klone mit einer Klasse von mRNA Molekülen hybridisieren, die eine Länge von 1100 nt (Nukleotiden) aufweisen. Diese zeigen eine Kreuz-Hybridisierung mit einer Cab-Gensonde aus Tabak. Die anderen 4 cDNA Klone hybridisieren mit einer Klasse von mRNA-Molekülen mit einer Grösse von 900 bis 1000 nt, was der Grösse der rbcS (mRNA der kleinen Untereinheit der Ribulosebiphosphatcarboxylase) entspricht.

Nach Durchführung einer Hybridselektion mit Hilfe dieser 4 cDNA Klone wird mRNA aus Baumwollblättern freigesetzt und *in-vitro* [wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben] unter Verwendung eines *in-vitro* Retikulocyten-Translationskits (Promega Biotec) translatiert.

Eine anschliessend durchgeführte Elektrophorese an einem Polyacrylamidgel zeigt eine Hauptpolypeptidbande bei ungefähr 20 Kd. Dies entspricht dem Molekulargewicht der RuBPCase Vorstufe (Precursor).

Die anderen drei cDNA Klone zeigen eine Kreuzhybridisierung mit dem Klon, der für das Hybrid-Freisetzungsexperiment verwendet wurde. Grosse Teile dieser cDNA Klone werden nach einer Klonierung im Phagen M13 unter Verwendung der Dideoxy-Kettenabbruch Technik (Sanger et al., 1977) sequenziert. Ein Vergleich dieser Sequenzen mit zuvor bereits aus anderen Spezies isolierten und publizierten rbcS Sequenzen macht deutlich, dass es sich auch in diesem Fall um rbcS cDNA Klone handelt.

Beispiel 30: Isolation genomischer Klone der kleinen Untereinheit der Baumwoll RuBPCase30.1. Genomische "Southern Blot" Analyse von Baumwolle

5 Genomische "Southern Blots" werden mit Hilfe von Standardverfahren unter Verwendung von Nitrocellulosefiltern hergestellt. Die Prähybridisierungs-, Hybridisierungs- und Waschbedingungen entsprechen denjenigen, die bei Klessig et al (1983) beschrieben sind.

Die genomische "Southern Blot" Analyse unter Verwendung des zuvor beschriebenen rbcS cDNA Klones als Sonde liefert 4 bis 5 genomische Fragmente, je nach dem welche Restriktionsenzyme für die Verdauung der DNA verwendet werden.

10 Die RuBPCase in Baumwolle wird durch eine kleine Genfamilie kodiert, wie dies auch in anderen, früher bereits untersuchten Spezies der Fall ist. Die rbcS Multigenfamilie der Baumwolle umfasst schätzungsweise mindestens 5 Mitglieder.

30.2. Isolation von genomischen rbcS Klonen

15 Für die Konstruktion einer genomischen Baumwoll-Genbibliothek wird die mit Sau3a teilweise verdaute Baumwoll-DNA über einen 10%igen bis 40%igen Saccharose-Gradienten nach der Grösse aufgetrennt und anschliessend in die  $\lambda$  EMBL3 Arme (Stratagene) eingespleisst.

Die Verpackung der  $\lambda$  Rekombinanten erfolgt unter Verwendung eines "Packagene Kits" (Stratagene). Es schliesst sich eine Transfektion in den *E. coli*-Stamm K802 an.

20 Duplizierte Nitrocellulosefilter-Abdrücke werden, wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben (Seite 320), unter Verwendung des oben beschriebenen rbcS cDNA Klons als Probe gescreent.

Zwölf positive Klone werden aus einer Gesamtzahl von 450'000 Plaques herausgereinigt. Die DNA wird aus Plattenlysaten dieser rekombinanten Phagen isoliert, wie dies bei Maniatis et al (1982) auf Seite 80 beschrieben ist.

25 Nach einem Vergleich dieser genomischen Klone anhand ihrer Restriktionsmuster, die mit verschiedenen Restriktionsenzymen erhalten werden, können insgesamt 5 verschiedene rbcS Gene identifiziert werden. Jeder dieser Klone wird erneut in dem Plasmidvektor pBSM13 (Stratagene) kloniert.

Die erhaltenen Subklone werden anschliessend vermessen ("mapped") und teilweise sequenziert, um auf diese Weise das 5' Ende sowie das erste ATG-Kodon (Translations-Startsignal) des Gens aufzufinden.

30 Eine Gen-Karte von zwei dieser genomischen Subklone, rbc-gX und rbc-gY ist in Fig. 24 wiedergegeben.

Die  $\lambda$  Phagen EMBL3, die die genomische DNA der rbc-gX sowie der rbc-gY Subklone enthalten, sind bei der als Internationale Hinterlegungsstelle anerkannten "American Type Culture Collection" in Rockville, Maryland hinterlegt.

30.3. Untersuchung der Expressionsrate von rbcS Genfragmenten in Baumwollblättern

35 41 weitere rbcS cDNA Klone werden aus der cDNA-Bibliothek von Baumwollblättern isoliert. Die Restriktionsanalyse, Sequenzierung und Hybridisierung dieser cDNA Klone mit Gen-spezifischen Sonden erlaubt die Schlussfolgerung, dass das Gen, welches in dem genomischen rbc-gX Klon enthalten ist, für ca. 17 % der rbcS Transkripte im Baumwollblatt verantwortlich ist.

40

Beispiel 31: Konstruktion chimärer Gene unter Verwendung von rbcS Promotoren aus Baumwolle31.1. Insertion einer NcoI Schnittstelle am ersten ATG Kodon der rbcS Transitpeptide kodierenden Gene

45 Die Sequenzen der Transitpeptide rbc-gX und rbc-gY sowie der kodierenden Gene sind in den Fig. 26 und 25 wiedergegeben.

Am ersten ATG Startkodon dieser Transitpeptid-kodierenden Gene wird eine NcoI Schnittstelle (CCATGG) eingefügt.

50 Dies wird erreicht durch Klonierung des PstI-EcoRI Fragmentes des rbc-gX Gens und des XbaI-SphI Fragmentes des rbc-gY Gens (gestreifte Fragmente in Fig. 22 und Fig. 23) in mp18 bzw. mp19 und Verwendung von Standardverfahren im Rahmen einer Oligonukleotid-vermittelten gerichteten Mutagenese ("site-directed mutagenesis") für die Einführung der NcoI Schnittstelle.

31.2. Konstruktion von pCIB301, einem Plasmid mit einem chimären Gen, das ein deletiertes Bt Protoxinogen (607 Deletion) unter der Kontrolle eines rbc-gX Promotors enthält

55 Nach der Schnittstelle-spezifischen Mutagenese wird doppelsträngige, replikative (ds rf) DNA aus dem M13 Klon isoliert und anschliessend mit HindIII und EcoRI verdaut. Das HindIII-EcoRI Fragment, das den rbc-gX Promotor enthält, wird zusammen mit dem HindIII und EcoRI verdauten Plasmid pUC19 verknüpft. Mit dem Verknüpfungsgemisch ("ligation mix") wird dann *E. coli* Stamm HB101 transformiert.

60 Aus Ampicillin-selektierten Transformanten wird Plasmid DNA isoliert und mit HindIII verdaut. Die Enden der resultierenden Moleküle werden mit glatten Enden versehen, indem sie mit der Klenow-Untereinheit der DNA Polymerase I behandelt werden. Anschliessend werden an diese glatten Enden Sall Linker angehängt. Das resultierende lineare Molekül wird mit Sall und NcoI verdaut und über ein Gel gereinigt.

65 In einer Dreifachverknüpfung ("three-part ligation") wird das Gelgereinigte Sall-NcoI Fragment mit einem Gelgereinigten BamHI-Sall Fragment des Plasmids pCIB770, einem Replikon, das einen weiten Wirtsbereich besitzt und als ein *Agrobacterium* Ti-plasmid Klonierungsvektor verwendet wird (Rothstein et al, 1987), sowie

mit einem Gel-gereinigten NcoI-BamHI Fragment, das das verkürzte, 607 Aminosäuren kodierende *Bt* Toxigen enthält, verknüpft. Das Verknüpfungsgemisch ("ligation mix") wird in *E. coli* Stamm HB101 transformiert.

Das resultierende Plasmid pCIB1301, das in den Fig. 20, 21 und 22 graphisch dargestellt ist, wird auf Kanamycin selektioniert.

### 31.3. Konstruktion von pCIB1302, einem Plasmid mit einem chimären Gen, das ein deletiertes *Bt* Protoxigen (607 Deletion) unter der Kontrolle eines *rbc-gY* Promotors enthält.

Nach der erfolgten Mutagenese wird doppelsträngige, replikative (ds rf) DNA aus den M13 Klonen isoliert und anschließend mit XbaI-NcoI verdaut. Das ca. 1.97 kbp umfassende NcoI-BamHI Fragment, welches das deletierte Gen enthält, wird dann zusammen mit dem XbaI-NcoI *rbc-gY* Promotorfragment in einer Dreifachverknüpfung in das XbaI-BamHI geschnittene Plasmid pCIB10/710 eingespleisst.

Das resultierende Plasmid pCIB1302, dessen Struktur in Fig. 23 wiedergegeben ist, wird auf Kanamycin selektioniert.

### Literaturverzeichnis

- An, G., Watson, B.D., Stachel, S., Gordon, M.P., Nester E.W., EMBO J. **4**, 277, 1985
- Ang, B.J., Nickerson, K.W., Appl. Environ. Microbiol. **36**, 625, 1978
- Barton, K.A., Chilton, M.-D., in: Wu, R., Grossmann, L., Moldave, K., Methods in Enzymology **101**, 527, 1983
- Beasley, Ting, Am. J. Bot. **60**, 130, 1973
- Bevan, M., Barnes, W.M., Chilton, M.-D., Nucl. Acids Res. **11**, 369, 1983
- Bevan, M.W., Flavell, R.B., Chilton, M.-D., Nature **304**, 184, 1983
- Bevan, M., Nucl. Acids Res. **12**, 8711, 1984
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S., Gene **2**, 95, 1977
- Bradford, M., Anal. Biochem. **72**, 248, 1976
- Caplan, A., Herrera-Estrella, L., Inzé, D., van Haute, E., van Montagu, M., Schell, J., Zambryski, P., Science **222**, 815, 1983
- Chaleff, R.S., Ray, T.B., Science **223**, 1148, 1984
- Cheng et al., Plant Sci. Lett. **19**, 91, 1980
- Chilton, M.-D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA **77**, 7347, 1974
- Chilton, M.-D., Farrand, S.K., Levin, R., Nester, E.W., Genetics **83**, 609, 1976
- Chilton, M.-D., Bevan, M.W., Yadav, N., Matzke, A.J.M., Byrne, M., Grula, M., Barton, K., Vanderleyden, J., de Framond, A., Barnes, W.M., Stadler Genetics Symposia Series **13**, 39, 1981
- Chilton, M.-D., in: the Role of Plant Biotechnology in Plant Breeding, Bericht des 1984 Plant Breeding Research Forum, 21.-23. August 1984, 177, 1985
- Clark M.F. et al., Methods in Enzymology **118**, 742, 1986
- Comai, L., Schilling-Cordaro, C., Mergia, A., Houck, C.M., Plasmid **10**, 21, 1983
- Covey, S.N., Lomonosoff, G.P., Hull, R., Nucl. Acids Res. **9**, 6735, 1981
- Deacon, J.W., Aspects of Microbiology **7**, ed. Cole et al., American Society of Microbiology, 1983
- DeBlock et al., EMBO Journal **3**, 1681, 1984
- van den Elzen, P.J.M., Townsend, J., Lee, K.Y., Bedbrook, J.R., Plant. Mol. Biol. **5**, 299, 1985
- Fillatti, J. et al., Mol. Gen. Genet. **206**, 192, 1987
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L., Woo, S.C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 4803, 1983
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eichholtz, D.A., Flick, J.S., Fink, C.L., Hoffmann, N.L., Sanders, P.R., Biotechnology **3**, 629, 1985
- de Framond, A.J., Barton, K.A., Chilton, M.-D., Biotechnology **1**, 262, 1983
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., Exptl. Cell Res. **50**, 151, 1968
- Gelser, M., Schweitzer, S., Grimm, C., Gene **48**, 109, 1986
- Gritz, L., Davies, J., Gene **25**, 179, 1983
- Hernalsteens, J.P., van Vilet, F., de Beuckeleer, M., Depicker, A., Engler, G., Lemmers, M., Holsters, M., van Montagu, M., Schell, J., Nature **287**, 654, 1980
- Hinnen, A., Hicks, J.B., Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 1929, 1978
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykas, P.J.J., Schilperoort, R.A., Nature **303**, 179, 1983
- Hohn, T., Richards, K., Lebeurier, G., in: Gene cloning in organisms other than *E.coli*, Current Topics in Microbiology and Immunology **96**, 193, 1982
- Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., Schell, J., Mol. Gen. Genet. **163**, 181, 1978
- Klausner, A., Biotechnology **2**, 408, 1984
- Klee, H.J., Yanofsky, M.F., Nester, E.W., Biotechnology **3**, 637, 1985
- Klessig et al., Plant Mol. Biol. Reporter. **1**, 12, 1983
- Koper-Zwarthoff, E.C., Lockard, R.E., Alzner-Deweerd, B., RajBhandary, U.L., Bol, J.F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5504, 1977

- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1982
- Matzke, A.J.M., Chilton, M.D., J. Mol. Appl. Genet. **1**, 39, 1981
- Messing, J., in: Wu, R., Grossmann, L., Moldave, K., Methods in Enzymology **101**, 20, 1983
- 5 Miller, L.K., Lingg, A.J., Bulla, L.A., Science **219**, 715, 1983
- Morelli, G., Nagy, F., Fraley, R.T., Rogers, S.G., Chua, N.H., Nature **315**, 200, 1985
- Murashige, T., Skoog, F., Physiol. Plant. **15**, 473, 1962
- Nagy, I.J., Maliga, P., Z. Pflanzenphysiol. **78**, 453, 1976
- Newbury, Possingham, Plant Physiol. **60**, 543, 1977
- 10 Norrander, J., Kempe, T., Messing, J., Gene **26**, 101, 1983
- Odell et al., 1985
- Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M., J. Mol. Biol. **147**, 217, 1981
- Okayama, Berg, Mol. Cell. Biol. **2**, 161, 1982
- Ooms, G., Regensburg-Tuink, T.J.G., Hofker, M.H., Hoekema, A., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A., Plant
- 15 Molecular Biology **1**, 265, 1982
- Paszkowski, J., Shillito, R.D., Saul, M., Mandak, V., Hohn, T., Hohn, B., Potrykus, I., EMBO J. **3**, 2717, 1984
- Rothstein, S.J., Lahners, K.N., Lotstein, R.J., Carozzi, N.B., Jayne, S.M., Rice, D.A., Gene **53**, 153, 1987
- Sanger et al., 1977
- Sekar, V., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 7036, 1987
- 20 Simon, R., Priefer, U., Pühler, A., in: Pühler, A. (Hrsg.), Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction, Springer Verlag, Berlin, 98, 1983
- Velten, 3., Velten, L., Hain, R., Schell, J., EMBO J. **3**, 2723, 1984
- Wang, K., Herrera-Estrella, L., van Montagu, M., Zambryski, P., Cell **38**, 455, 1984
- White, Phytomorphology **11**, 19, 1961
- 25 Wong, H.C., Schnepf, H.E., Whiteley, H.R., J. Biol. Chem. **258**, 1960, 1983
- Yadav, N.S., Vanderleyden, J., Bennett, D.R., Barnes, W.M., Chilton, M.D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 6322, 1982
- Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J., Gene **33**, 103, 1985
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., van Montagu, M., Schell, J., EMBO J. **2**, 2143, 1983
- 30 Zoller, M.J., Smith, M., in: Wu, R., Grossmann, L., Moldave, K., Methods in Enzymology **100**, 468, 1983

### 35 Patentansprüche

1. Eine Baumwoll-Zelle, die ein chimäres Gen enthält, welches ein Polypeptid exprimiert, das im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften des *Bacillus thuringiensis* Kristallproteins aufweist.
- 40 2. Eine Zelle gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Zellen von Baumwollpflanzen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum* oder *Gossypium barbadense* handelt.
3. Eine Zelle gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Zellen von *Gossypium hirsutum* handelt.
- 45 4. Eine Zelle gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Zellen der Baumwollvarietäten Acala SJ-2, Acala GC 510, Acala B-1644 oder Siokra handelt.
5. Eine Zelle gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor, die 5'-nichttranslatierte Region und gegebenenfalls die 3'-nichttranslatierte Region des chimären Gens aus Pflanzen- oder Pflanzenvirusgenen stammen.
- 50 6. Eine Zelle gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor, die 5'-nichttranslatierte Region und gegebenenfalls die 3'-nichttranslatierte Region des chimären Gens aus einem pflanzlichen Gen stammen, das die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase oder das Chlorophyll a/b-Bindungsprotein kodiert.
7. Eine Zelle gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor, die 5'-nichttranslatierte Region und gegebenenfalls die 3'-nichttranslatierte Region aus einem Gen eines DNA-Pflanzenvirus stammen.
- 55 8. Eine Zelle gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagtem Pflanzenvirus um Cauliflower Mosaik Virus handelt.
9. Eine Zelle gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich beim Cauliflower Mosaik Virus Promotor um den 35S Promotor des CaMV Gens VI handelt.
- 60 10. Eine Zelle gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor, die 5'-nichttranslatierte Region und gegebenenfalls die 3'-nichttranslatierte Region des chimären Gens aus DNA-Sequenzen stammen, die in den Plasmiden von *Agrobacterium* vorliegen und die zu einer Expression in Pflanzen führen.
- 65 11. Eine Zelle gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Promotor aus dem Ti-Plasmid



von *Agrobacterium tumefaciens* stammt.

12. Eine Zelle gemäss Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass besagte DNA Sequenzen aus einem Gen stammen, das Octopinsynthese kodiert.

13. Eine Zelle gemäss Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass besagte DNA Sequenzen aus einem Gen stammen, das Nopalinsynthese kodiert.

14. Eine Zelle gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid ein Mr von etwa 130 000 bis etwa 140 000 hat oder insektizide Fragmente davon umfasst.

15. Eine Zelle gemäss Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid mit einem anderen Molekül verknüpft ist.

16. Eine Zelle gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das chimäre Gen in wesentlichen Teilen zu der Nukleotidsequenz komplementär ist, die das kristalline  $\delta$ -Endotoxin Protein von *B. thuringiensis* kodiert.

17. Eine Zelle gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das chimäre Gen in der Lage ist, mit der kodierenden Sequenz desjenigen Gens, welches das kristalline  $\delta$ -Endotoxin Protein von *B. thuringiensis* kodiert, zu hybridisieren.

18. Eine Zelle gemäss Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid im wesentlichen die selben immunologischen Eigenschaften hat wie das kristalline Protein von *B. thuringiensis*.

19. Eine Zelle gemäss einem der Ansprüche 16, 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagtem *B. thuringiensis* um eine Unterart handelt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *Bt* var. *berliner*, *Bt* var. *alesti*, *Bt* var. *tolworthi*, *Bt* var. *sotto*, *Bt* var. *dendrolimus*, *Bt* var. *tenebrionis*, *Bt* var. *san diego* und *Bt* var. *aizawai*.

20. Eine Zelle gemäss Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um die *B. thuringiensis* Varietät *kurstaki* HD1 handelt.

21. Eine Zelle gemäss Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das chimäre Gen ein Polypeptid exprimiert, welches die folgende Aminosäuresequenz aufweist:

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys	10	
Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser Asn Pro Glu	20	30
Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu	30	
Thr Gly Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu	40	
Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser Glu Phe	50	35
Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu	60	
Val Asp Ile Ile Trp Gly Ile Phe Gly Pro	70	
Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile	80	40
Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu	90	
Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile Ser Arg Leu	100	
Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr	110	45
Ala Glu Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp	120	
Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu Met	130	
Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala	140	50
Leu Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val	150	
Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val	160	
Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser	170	55
Val Leu Arg Asp Val Ser Val Phe Gly Gln	180	
Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn	190	60

65

	Ser Arg Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile	200
	Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val Arg Trp	210
5	Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly	220
	Pro Asp Ser Arg Asp Trp Ile Arg Tyr Asn	230
	Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val	240
10	Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr	250
	Asp Ser Arg Thr Tyr Pro Ile Arg Thr Val	260
	Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn	270
15	Pro Val Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe	280
	Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu Gly Ser	290
	Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu	300
20	Asn Ser Ile Thr Ile Tyr Thr Asp Ala His	310
	Arg Gly Glu Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln	320
	Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly	330
25	Pro Glu Phe Thr Phe Pro Leu Tyr Gly Thr	340
	Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile	350
	Val Ala Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg	360
30	Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg Arg Pro	370
	Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu	380
	Ser Val Leu Asp Gly Thr Glu Phe Ala Tyr	390
35	Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val	400
	Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu	410
	Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asn Asn Asn Val	420
40	Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu	430
	Ser His Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe	440
	Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile Arg Ala	450
45	Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala	460
	Glu Phe Asn Asn Ile Ile Pro Ser Ser Gln	470
	Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr	480
50	Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys	490
	Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu	500
	Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr	510
55	Leu Arg Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser	520
	Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr Ala	530
	Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser	540
60	Ile Asp Gly Arg Pro Ile Asn Gln Gly Asn	550
	Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn	560

65

Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly	570	
Phe Thr Thr Pro Phe Asn Phe Ser Asn Gly	580	
Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val	590	5
Phe Asn Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp	600	
Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu Val Thr	610	
Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala	620	10
Gln Lys Ala Val Asn Glu Leu Phe Thr Ser	630	
Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val	640	
Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn	650	15
Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys	660	
Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys	670	
Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu	680	20
Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg	690	
Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp	700	
Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly	710	25
Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val	720	
Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr	730	
Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu	740	30
Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln	750	
Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp	760	
Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala	770	35
Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr	780	
Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser	790	
Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His	800	40
His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys	810	
Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp	820	
Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly	830	45
His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu	840	
Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu	850	
Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp	860	50
Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu	870	
Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu	880	
Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln	890	55
Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile	900	
Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val	910	
His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu	920	60
Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala	930	

65

	Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe	940
	Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn	950
5	Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly	960
	Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val	970
	Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser	980
10	Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu	990
	Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly	1000
	Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr	1010
15	Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr	1020
	Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu	1030
	Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu	1040
20	Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn	1050
	Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu	1060
	Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr	1070
25	Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val	1080
	Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu	1090
	Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn	1100
30	Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp	1110
	Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr	1120
	Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp	1130
35	Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu	1140
	Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu	1150
40	Leu Leu Met Glu Glu End	1156

45 22. Eine Zelle gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Region folgende DNA Sequenz aufweist:

50

55

60

65

EP 0 317 511 A2

10	20	30	40	50	60	
GTAAACACCC	TGGGTCAAAA	ATTGATATTT	AGTAAAATTA	GTTGCACITT	GTGCATTTTT	
70	80	90	100	110	120	5
TCATAAGATG	AGTCATATGT	TTTAAATTGT	AGTAATGAAA	AACAGTATTA	TATCATAATG	
130	140	150	160	170	180	10
AATTGGTATC	TTAATAAAAAG	AGATGGAGGT	AACTTATGGA	TAACAATCCG	AACATCAATG	
190	200	210	220	230	240	
AATGCATTCC	TTATAATTGT	TTAAGTAACC	CTGAAGTAGA	AGTATTAGGT	GGAGAAAGAA	
250	260	270	280	290	300	15
TAGAAACTGG	TTACACCCCA	ATCGATATTT	CCTTGTGCT	AACGCAATTT	CTTTTGAGTG	

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

EP 0 317 511 A2

	310	320	330	340	350	360
	AATTTGTTCC	CGGTGCTGGA	TTTGTGTTAG	GACTAGTTGA	TATAATATGG	GGAATTTTTG
5	370	380	390	400	410	420
	GTCCCTCTCA	ATGGGACGCA	TTTCTTGTAC	AAATTGAACA	GTTAATTAAC	CAAAGAATAG
	430	440	450	460	470	480
10	AAGAATTCGC	TAGGAACCAA	GCCATTTCTA	GATTAGAAGG	ACTAAGCAAT	CTTTATCAAA
	490	500	510	520	530	540
	TTTACGCAGA	ATCTTTTAGA	GAGTGGGAAG	CAGATCCTAC	TAATCCAGCA	TTAAGAGAAG
15	550	560	570	580	590	600
	AGATGCGTAT	TCAATTC AAT	GACATGAACA	GTGCCCTTAC	AACCGCTATT	CCTCTTTTTG
	610	620	630	640	650	660
20	CAGTTC AAAA	TTATCAAGTT	CCTCTTTTAT	CAGTATATGT	TCAAGCTGCA	AATTTACATT
	670	680	690	700	710	720
	TATCAGTTTT	GAGAGATGTT	TCAGTGT TTG	GACAAAGGTG	GGGATTTGAT	GCCGCGACTA
25	730	740	750	760	770	780
	TCAATAGTCG	TTATAATGAT	TTAACTAGGC	TTATTGGCAA	CTATACAGAT	CATGCTGTAC
	790	800	810	820	830	840
30	GCTGGTACAA	TACGGGATTA	GAGCGTGTAT	GGGGACCGGA	TTCTAGAGAT	TGGATAAGAT
	850	860	870	880	890	900
	ATAATCAATT	TAGAAGAGAA	TTAACACTAA	CTGTATTAGA	TATCGTTTCT	CTATTTCCGA
35	910	920	930	940	950	960
	ACTATGATAG	TAGAACGTAT	CCAATTCGAA	CAGTTTCCCA	ATTAACAAGA	GAAATTTATA
	970	980	990	1000	1010	1020
40	CAAACCCAGT	ATTAGAAAAT	TTTGATGGTA	GTTTTCGAGG	CTCGGCTCAG	GGCATAGAAG
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	GAAGTATTAG	GAGTCCACAT	TTGATGGATA	TACTTAACAG	TATAACCATC	TATACGGATG
45	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	CTCATAGAGG	AGAATATTAT	TGGTCAGGGC	ATCAAATAAT	GGCTTCTCCT	GTAGGGTTTT
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
50	CGGGGCCAGA	ATTCACTTTT	CCGCTATATG	GAACATATGG	AAATGCAGCT	CCACAACAAC
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	GTATTGTTGC	TCAACTAGGT	CAGGGCGTGT	ATAGAACATT	ATCGTCCACT	TTATATAGAA
55	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	GACCTTTTAA	TATAGGGATA	AATAATCAAC	AACTATCTGT	TCTTGACGGG	ACAGAATTTG
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
60	CTTATGGAAC	CTCCTCAAAT	TTGCCATCCG	CTGTATACAG	AAAAAGCGGA	ACGGTAGATT

65

EP 0 317 511 A2

1390	1400	1410	1420	1430	1440	
CGCTGGATGA	AATACCGCCA	CAGAATAACA	ACGTGCCACC	TAGGCAAGGA	TTTAGTCATC	
1450	1460	1470	1480	1490	1500	5
GATTAAAGCCA	TGTTTCAATG	TTTCGTTTCA	GCTTTAGTAA	TAGTAGTGTA	AGTATAATAA	
1510	1520	1530	1540	1550	1560	10
GAGCTCCTAT	GTTCTCTTGG	ATACATCGTA	GTGCTGAATT	TAATAATATA	ATTCTTTCAT	
1570	1580	1590	1600	1610	1620	
CACAAATTAC	ACAAATACCT	TTAACAAAAT	CTACTAATCT	TGGCTCTGGA	ACTTCTGTCTG	
1630	1640	1650	1660	1670	1680	15
TTAAAGGACC	AGGATTTACA	GGAGGAGATA	TTCTTCGAAG	AACTTCACCT	GGCCAGATTT	
1690	1700	1710	1720	1730	1740	20
CAACCTTAAG	AGTAAATATT	ACTGCACCAT	TATCACAAAG	ATATCGGGTA	AGAATTTCGCT	
1750	1760	1770	1780	1790	1800	
ACGCTTCTAC	CACAAATTTA	CAATTCCATA	CATCAATTGA	CGGAAGACCT	ATTAATCAGG	
1810	1820	1830	1840	1850	1860	25
GGAATTTTTC	AGCAACTATG	AGTAGTGGGA	GTAATTTACA	GTCCGGAAGC	TTTAGGACTG	
1870	1880	1890	1900	1910	1920	30
TAGGTTTTAC	TACTCCGTTT	AACTTTTCAA	ATGGATCAAG	TGTATTTACG	TTAAGTGCTC	
1930	1940	1950	1960	1970	1980	
AIGTCTTCAA	TTCAGGCAAT	GAAGTTTATA	TAGATCGAAT	TGAATTTGTT	CCGGCAGAAG	
1990	2000	2010	2020	2030	2040	35
TAACCTTTGA	GGCAGAATAT	GATTTAGAAA	GAGCACAAAA	GGCGGTGAAT	GAGCTGTTTA	
2050	2060	2070	2080	2090	2100	40
CTTCTTCCAA	TCAAATCGGG	TTAAAAACAG	ATGTGACGGA	TTATCATATT	GATCAAGTAT	
2110	2120	2130	2140	2150	2160	45
CCAATTTAGT	TGAGTGTTTA	TCTGATGAAT	TTTGTCTGGA	TGAAAAAAAA	GAATTGTCCG	
2170	2180	2190	2200	2210	2220	
AGAAAGTCAA	ACATGCGAAG	CGACTTAGTG	ATGAGCGGAA	TTTACTTCAA	GATCCAAACT	
2230	2240	2250	2260	2270	2280	50
TTAGAGGGAT	CAATAGACAA	CTAGACCGTG	GCTGGAGAGG	AAGTACGGAT	ATTACCATCC	
2290	2300	2310	2320	2330	2340	55
AAGGAGGCCA	TGACGTATTC	AAAGAGAATT	ACGTTACGCT	ATTGGGTACC	TTTGATGAGT	
2350	2360	2370	2380	2390	2400	
GCTATCCAAC	GTATTTATAT	CAAAAAATAG	ATGAGTCGAA	ATTAAAAGCC	TATACCCGTT	
2410	2420	2430	2440	2450	2460	60
ACCAATTAAG	AGGGTATATC	GAAGATAGTC	AAGACTTAGA	AATCTATTTA	ATTGCTTACA	
2470	2480	2490	2500	2510	2520	65
ATGCCAAACA	CGAAACAGTA	AATGTGCCAG	GTACGGGTTC	CTTATGGCCG	CTTTCAGCCC	

EP 0 317 511 A2

2530 2540 2550 2560 2570 2580  
CAAGTCCAAT CGGAAAATGT GCCCATCATT CCCATCATT CTCCTTGGAC ATTGATGTTG

5 2590 2600 2610 2620 2630 2640  
GATGTACAGA CTTAAATGAG GACTTAGGTG TATGGGTGAT ATTCAAGATT AAGACGCAAG

10 2650 2660 2670 2680 2690 2700  
ATGGCCATGC AAGACTAGGA AATCTAGAAT TTCTCGAAGA GAAACCATTG GTAGGAGAAG

2710 2720 2730 2740 2750 2760  
CACTAGCTCG TGTGAAAAGA GCGGAGAAAA AATGGAGAGA CAAACGTGAA AAATTGGAAT

15 2770 2780 2790 2800 2810 2820  
GGGAAACAAA TATTGTTTAT AAAGAGGCAA AAGAATCTGT AGATGCTTTA TTTGTAAACT

2830 2840 2850 2860 2870 2880  
20 CTCAATATGA TAGATTACAA GCGGATACCA ACATCGCGAT GATTCATGCG GCAGATAAAC

2890 2900 2910 2920 2930 2940  
GCGTTCATAG CATTGAGAAA GCTTATCTGC CTGAGCTGTC TGTGATTCCG GGTGTCAATG

25 2950 2960 2970 2980 2990 3000  
CGGCTATTTT TGAAGAATTA GAAGGGCGTA TTTTCACTGC ATTCTCCCTA TATGATGCCA

3010 3020 3030 3040 3050 3060  
30 GAAATGTCAT TAAAAATGGT GATTTTAATA ATGGCTTATC CTGCTGGAAC GTGAAAGGGC

3070 3080 3090 3100 3110 3120  
ATGTAGATGT AGAAGAACAA AACAACCACC GTTCGGTCCT TGTGTTCCG GAATGGGAAG

35 3130 3140 3150 3160 3170 3180  
CAGAAGTGTC ACAAGAAGTT CGTGTCTGTC CGGGTCGTGG CTATATCCTT CGTGTACACG

3190 3200 3210 3220 3230 3240  
40 CGTACAAGGA GGGATATGGA GAAGGTTGCG TAACCATTCA TGAGATCGAG AACAAATACAG

3250 3260 3270 3280 3290 3300  
ACGAACTGAA GTTTAGCAAC TGTGTAGAAAG AGGAAGTATA TCCAAACAAC ACGGTAACGT

45 3310 3320 3330 3340 3350 3360  
GTAATGATTA TACTGCGACT CAAGAAGAAT ATGAGGGTAC GTACACTTCT CGTAATCGAG

3370 3380 3390 3400 3410 3420  
50 GATATGACGG AGCCTATGAA AGCAATTCTT CTGTACCAGC TGATTATGCA TCAGCCTATG

3430 3440 3450 3460 3470 3480  
AAGAAAAAGC ATATACAGAT GGACGAAGAG ACAATCCTTG TGAATCTAAC AGAGGATATG

55 3490 3500 3510 3520 3530 3540  
GGGATTACAC ACCACTACCA GCTGGCTATG TGACAAAAGA ATTAGAGTAC TTCCCAGAAA

3550 3560 3570 3580 3590 3600  
60 CCGATAAGGT ATGGATTGAG ATCGGAGAAA CGGAAGGAAC ATTCATCGTG GACAGCGTGG

65



3610	3620	3630	3640	3650	3660	
AATTACTTCT	TATGGAGGAA	TAATATATGC	TTTATAATGT	AAGGTGTGCA	AATAAAGAAT	
3670	3680	3690	3700	3710	3720	5
GATTACTGAC	TTGTATTGAC	AGATAAATAA	GGAAATTTTT	ATATGAATAA	AAAACGGGCA	
3730	3740	3750	3760	3770	3780	10
TCACTCTTAA	AAGAATGATG	TCCGTTTTTT	GTATGATTTA	ACGAGTGATA	TTTAAATGTT	
3790	3800	3810	3820	3830	3840	
TTTTTTGCGA	AGGCTTTACT	TAACGGGGTA	CCGCCACATG	CCCATCAACT	TAAGAATTTG	
3850	3860	3870	3880	3890	3900	15
CACTACCCCC	AAGTGTCAAA	AAACGTTATT	CTTTCTAAAA	AGCTAGCTAG	AAAGGATGAC	
3910	3920	3930	3940	3950	3960	20
ATTTTTTATG	AATCTTTCAA	TTCAAGATGA	ATTACAACATA	TTTTCTGAAG	AGCTGTATCG	
3970	3980	3990	4000	4010	4020	
TCATTTAACC	CCTTCTCTTT	TGGAAGAACT	CGCTAAAGAA	TTAGGTTTTG	TAAAAAGAAA	
4030	4040	4050	4060	4070	4080	25
ACGAAAGTTT	TCAGGAAATG	AATTAGCTAC	CATATGTATC	TGGGGCAGTC	AACGTACAGC	
4090	4100	4110	4120	4130	4140	30
GAGTGATTCT	CTCGTTCGAC	TATGCAGTCA	ATTACACGCC	GCCACAGCAC	TCTTATGAGT	
4150	4160	4170	4180	4190	4200	
CCAGAAGGAC	TCAATAAACG	CTTTGATAAA	AAAGCGGTTG	AATTTTTGAA	ATATATTTTT	
4210	4220	4230	4240	4250	4260	35
TCTGCATTAT	GGAAAAGTAA	ACTTTGTAAA	ACATCAGCCA	TTTCAAGTGC	AGCACTCAGC	
4270	4280	4290	4300	4310	4320	40
TATTTTCAAC	GAATCCGTAT	TTTAGATGCG	ACGATTTTCC	AAGTACCGAA	ACATTTAGCA	
4330	4340	4350	4360			45
CATGTATATC	CTGGGTCAGG	TGGTTGTGCA	CAAACGTCAG			

23. Eine Zelle gemäss Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das chimäre Gen ein insektizides Polypeptid exprimiert, das der in Anspruch 21 wiedergegebenen Aminosäuresequenz im wesentlichen homolog ist. 50

24. Eine Zelle gemäss Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das chimäre Gen der in Anspruch 22 wiedergegebenen DNA-Sequenz im wesentlichen homolog ist.

25. Eine Zellkultur bestehend aus Baumwollzellen gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4.

26. Eine Zellkultur gemäss Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei besagten Baumwollzellen um Zellen von *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum* und *Gossypium barbadense* handelt. 55

27. Eine Zellkultur gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Zellen von *Gossypium hirsutum* handelt.

28. Eine Zellkultur gemäss einem der Ansprüche 25 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Zellen um Protoplasten handelt. 60

29. Eine Baumwollpflanze, die ein chimäres Gen enthält, welches ein Polypeptid exprimiert, das die wesentlichen Insektentoxizitätseigenschaften des *Bacillus thuringiensis* Kristallproteins aufweist.

30. Eine Baumwollpflanze gemäss Anspruch 29, die ein chimäres Gen enthält, welches ein Polypeptid exprimiert, das die wesentlichen Insektentoxizitätseigenschaften des *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 65

HD1 Kristallproteins aufweist.

31. Eine Baumwollpflanze gemäss Anspruch 30, die ein chimäres Gen enthält, welches ein Polypeptid exprimiert, das im wesentlichen die Insektentoxizitätseigenschaften des *Bacillus thuringiensis* Kristallproteins aufweist und zwar in einer Menge, die ausreicht, die Pflanze unattraktiv und/oder toxisch für Lepidopterenlarven zu machen.

32. Eine Baumwollpflanze gemäss Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Pflanze ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum* oder *Gossypium barbadense* handelt.

33. Eine Baumwollpflanze gemäss Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um *Gossypium hirsutum* handelt.

34. Vermehrungsgut einer transgenen Baumwollpflanze gemäss einem der Ansprüche 29 bis 33.

35. Vermehrungsgut gemäss Anspruch 34, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Protoplasten, Zellen, Kalli, Gewebe, Embryonen, Organe, Samen, Pollen, Eizellen, Zygoten oder anderem, von einer transgenen Baumwollpflanze erhältlichen Vermehrungsgut.

36. Vermehrungsgut gemäss Anspruch 34, welches sich sexuell, asexuell, in-vitro oder in-vivo vermehren lässt.

37. Nachkommen einer transformierten Baumwollpflanze gemäss einem der Ansprüche 29 bis 33 oder Mutanten und Varianten davon, die noch die charakteristischen Eigenschaften des Ausgangsmaterials aufweisen, welche diese aufgrund der Transformation mit exogener DNA erhalten hat.

38. Ein Verfahren zur Herstellung eines transformierten embryogenen Baumwollkallus, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man:

(a) einen *Agrobacterium*-Vektor, der ein Gen enthält, welches Baumwollzellen eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin verleiht, mit einem Baumwoll-explantat für einen Zeitraum in Kontakt bringt, der ausreicht, um das Gen in das Explantat zu transferieren;

(b) das transformierte Explantat in einem Kallus-Wachstumsmedium für einen Zeitraum von etwa 15 bis 200 Stunden bei einer Temperatur von 25°C bis 35°C und einem Hell-/Dunkel-Rhythmus von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert, um auf diese Weise aus den Explantaten einen Kallus zu entwickeln;

(c) die inkubierten Explantate mit einem Kallus-Wachstumsmedium, das ein für *Agrobacterium* toxisch wirkendes Antibiotikum enthält, für einen Zeitraum in Kontakt bringt, der ausreicht die *Agrobakterien* abzutöten;

(d) den *Agrobacterium*-freien Kallus auf einem Kallus-Wachstumsmedium kultiviert;

(e) den resultierenden embryogenen Kallus mit dem Antibiotikum Hygromycin in Kontakt bringt und zwar in einer Konzentration, die ausreicht für eine Selektionierung eines Hygromycin-resistenten Kallus; und

(f) embryogenen Kallus selektioniert.

39. Verfahren gemäss Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass man in einem weiteren Verfahrensschritt den transformierten Kallus zur Keimung bringt und daraus ganze Pflänzchen entwickelt.

40. Verfahren gemäss Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass man den transformierten Kallus, bevor man ihn in Verfahrensschritt (c) mit dem Kallus-Wachstumsmedium in Kontakt bringt, abspült und zwar mit einem Kallus-Wachstumsmedium, das kein für *Agrobacterium* toxisches Antibiotikum enthält.

41. Verfahren gemäss Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass besagtes Explantat aus dem Hypokotyl oder den Keimblättern von Baumwollkeimlingen stammt oder aber, dass es sich um ein Gemisch davon handelt.

42. Verfahren gemäss Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass das Kallus-Wachstumsmedium ein Murashige und Skoog-Medium ist, das mit ca. 1 mg/Liter bis ca. 10 mg/Liter Naphthyl-1-essigsäure angereichert ist.

43. Verfahren gemäss Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem für *Agrobacterium* toxischen Antibiotikum um Cefotaxim handelt.

44. Verfahren zur Transformation von Baumwollzellen, die einer Suspensionskultur in einem Kallus-Wachstumsmedium unterzogen werden, das, nachdem ein erster Wachstumszyklus im Rahmen der Suspensionskultur durchlaufen wurde, durch die folgenden Verfahrensmassnahmen gekennzeichnet ist:

(a) Rückgewinnung der Zellen sowie von jeglichem embryogenen Kallus aus dem Kallus-Wachstumsmedium;

(b) Resuspendierung der Zellen und des embryogenen Kallus in einem Kallus-Wachstumsmedium, das einen *Agrobacterium*-Vektor enthält, der ein Gen besitzt, welches Baumwollzellen eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin verleiht, wobei die Bedingungen für das Wachstum in Suspension für einen Zeitraum aufrechterhalten werden, der für die Transformation der suspendierten Zellen ausreicht;

(c) Rückgewinnung der suspendierten Zellen aus dem *Agrobacterium*-haltigen Kallus-Wachstumsmedium;

(d) Behandlung der transformierten Zellen und des embryogenen Kallus mit einem Antibiotikum in einer Konzentration, die ausreicht die *Agrobakterien* abzutöten;

(e) in Kontaktbringen der Zellen und des embryogenen Kallus mit dem Antibiotikum Hygromycin

- zur Selektionierung der transformierten Zellen und des transformierten embryogenen Kallus;  
 (f) Filtrieren der Suspension zur Entfernung von embryogenem Kallus der eine Grösse von ca. 600 µm überschreitet.
45. Verfahren gemäss Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass die Verfahrensschritte (d) und (e) vor dem Verfahrensschritt (f) durchgeführt werden. 5
46. Verfahren gemäss Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass die Verfahrensschritte (d) und (e) nach dem Verfahrensschritt (f) durchgeführt werden.
47. Verfahren gemäss Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass der Verfahrensschritt (d) vor dem Verfahrensschritt (f) und dass der Verfahrensschritt (e) nach dem Verfahrensschritt (f) durchgeführt wird.
48. Verfahren gemäss Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass der Verfahrensschritt (e) vor dem Verfahrensschritt (f) und der Verfahrensschritt (d) nach dem Verfahrensschritt (f) durchgeführt wird. 10
49. Verfahren gemäss Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem in Verfahrensschritt (d) verwendeten Antibiotikum um Cefotaxim handelt.
50. Verfahren gemäss Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass der Wachstumszyklus im Rahmen der Suspensionskultur zwischen ca. 7 und 14 Tagen dauert. 15
51. Verfahren gemäss Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass in einem weiteren Verfahrensschritt die transformierten Baumwollzellen zu Pflänzchen entwickelt werden.
52. Baumwollpflanzen, die aufgrund einer Transformation eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin aufweisen.
53. Verfahren zum Schutz von Baumwollpflanzen vor Insektenfrass, dadurch gekennzeichnet, dass man innerhalb der die Pflanze aufbauenden Pflanzenzellen ein *Bt* Kristallprotein oder ein Protein, das im wesentlichen die Toxizitätseigenschaften des *Bt* Kristallproteins aufweist, in einer Menge exprimiert, die ausreicht, die Insektenlarven abzutöten oder aber diese unter Kontrolle zu halten. 20
54. Verfahren gemäss Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Lepidopteren-, Coleopteren- oder um Dipteren-Larven handelt. 25
55. Verfahren gemäss Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Lepidopteren-Larven handelt.
56. Verfahren zur Abtötung oder zur Kontrolle von Schadinsekten, dadurch gekennzeichnet, dass man sie mit Baumwollpflanzenzellen füttert, die chimäre Gene enthalten, welche eine insektizide Menge eines Toxins exprimieren, das im wesentlichen die Insektentoxizität des kristallinen Proteins von *Bt* aufweist. 30
57. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 53 oder 56, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein Kristallprotein der *Bt*-Varietät *kurstaki*HD1 handelt. 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

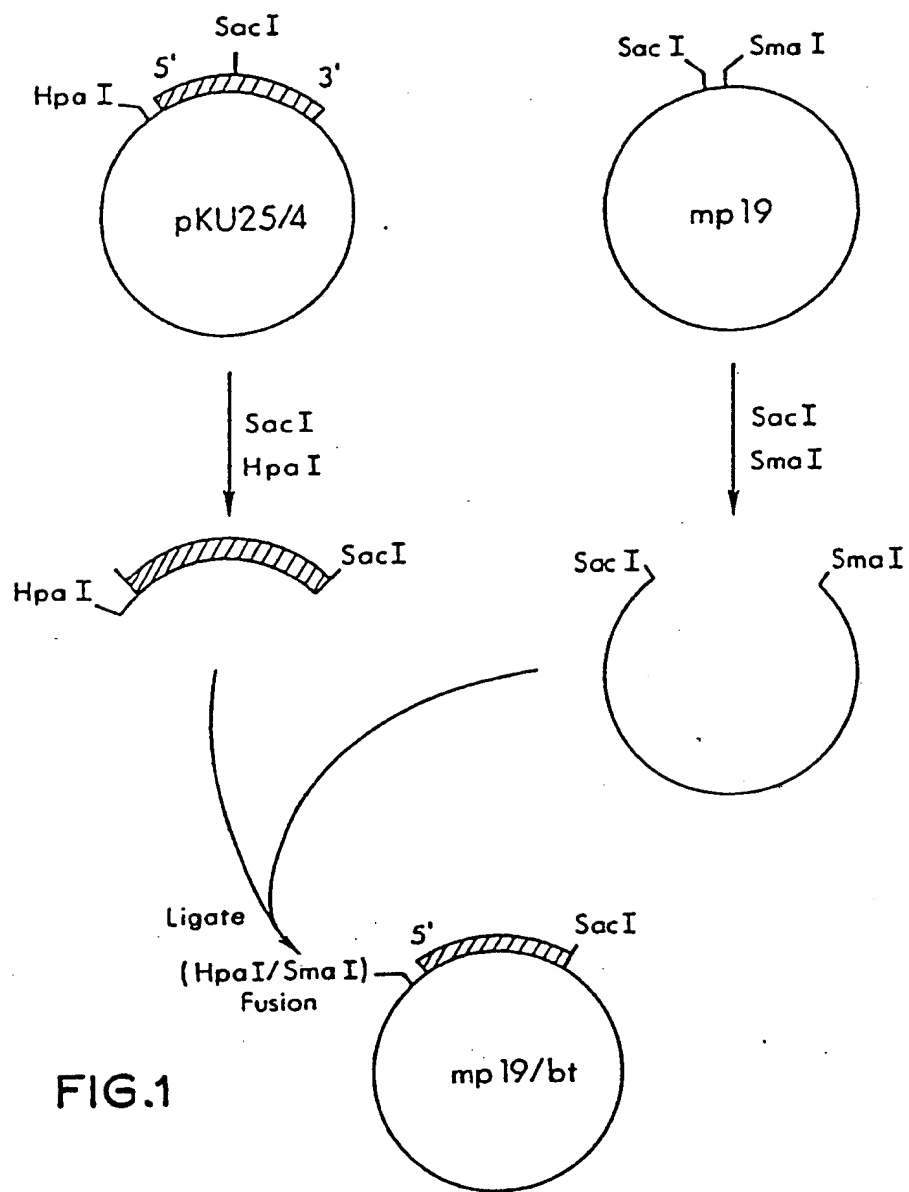


FIG.1

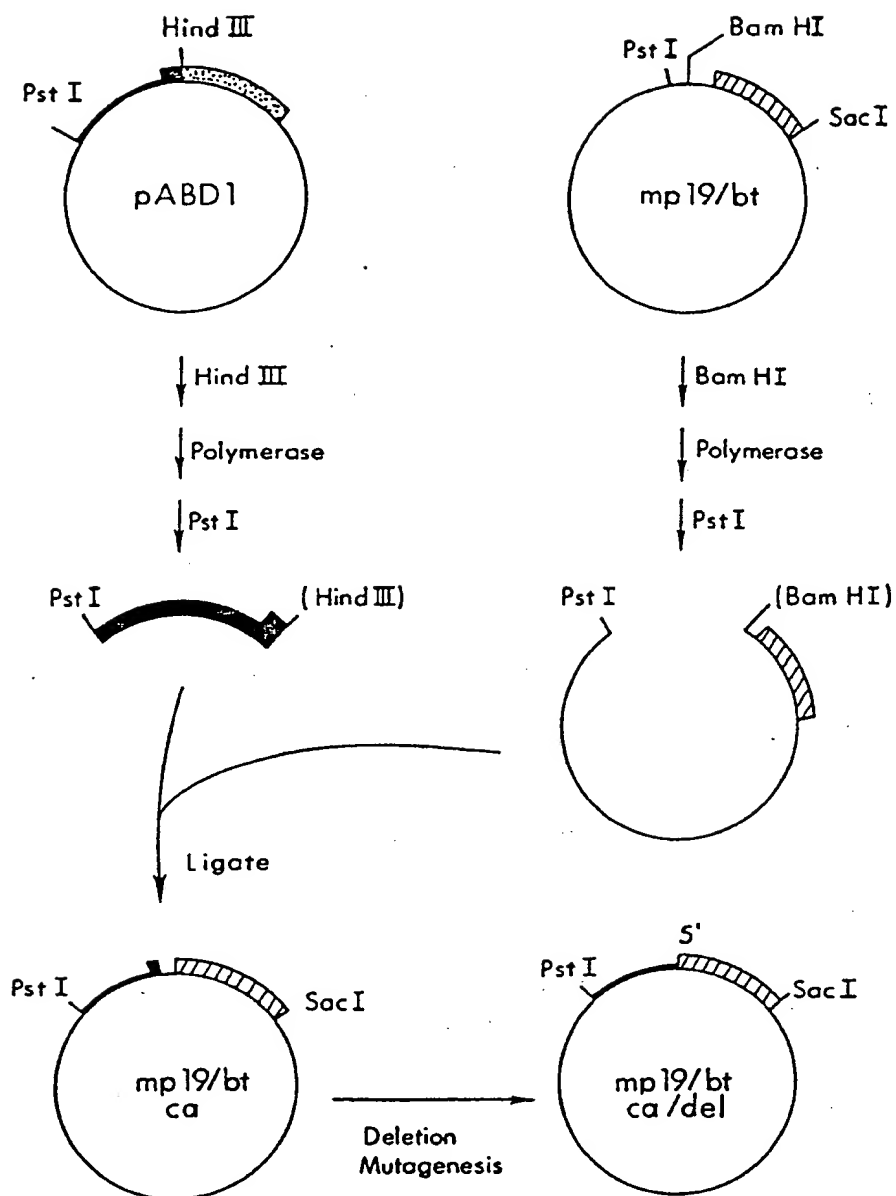


FIG.2

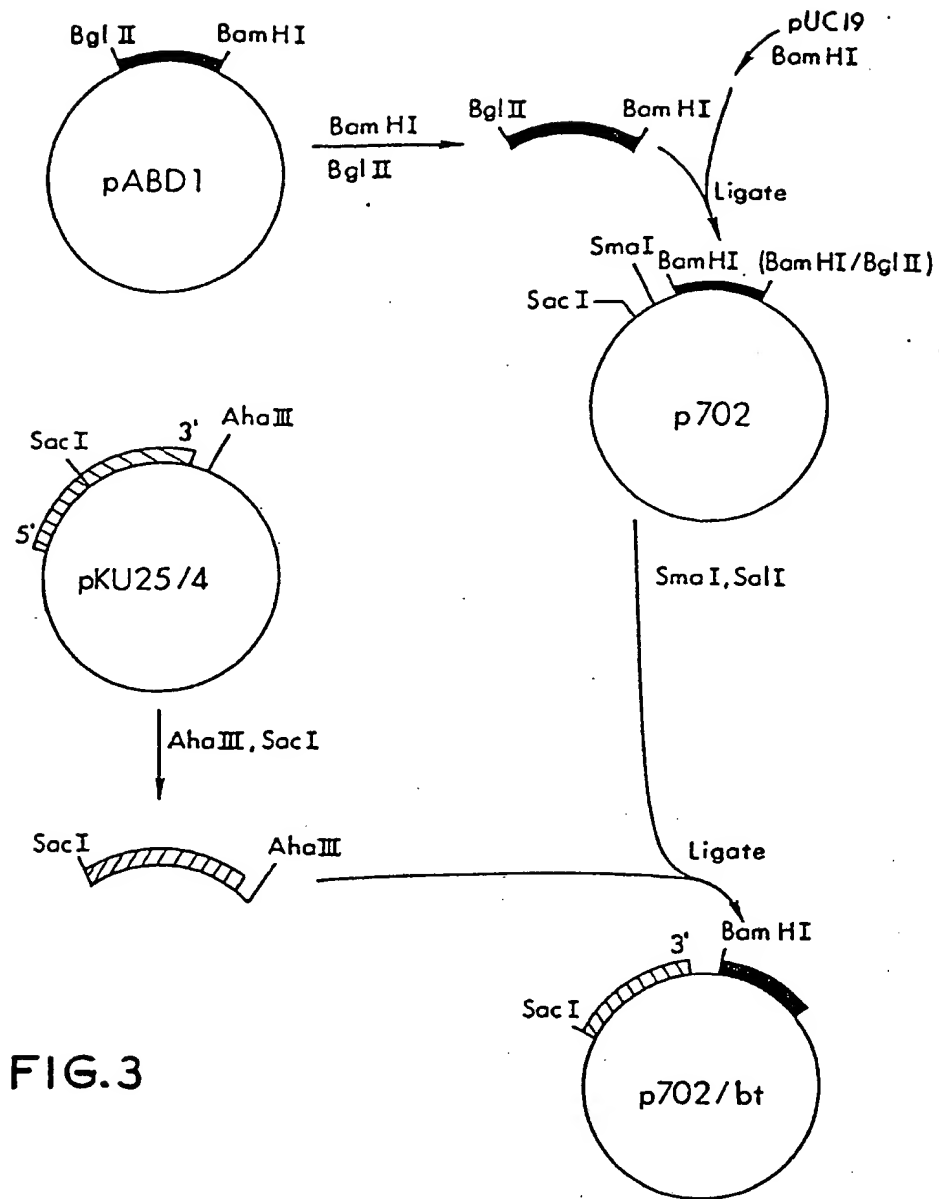


FIG.3

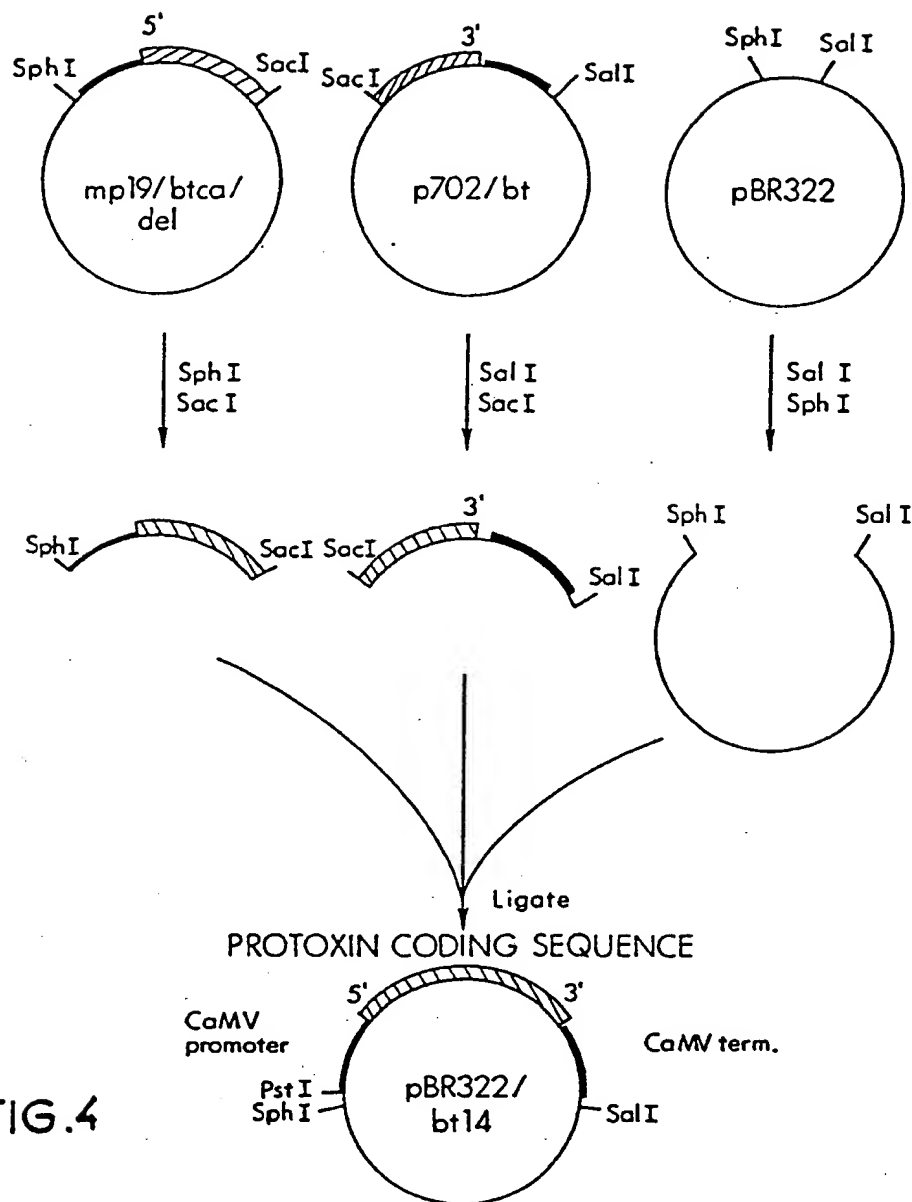


FIG.4

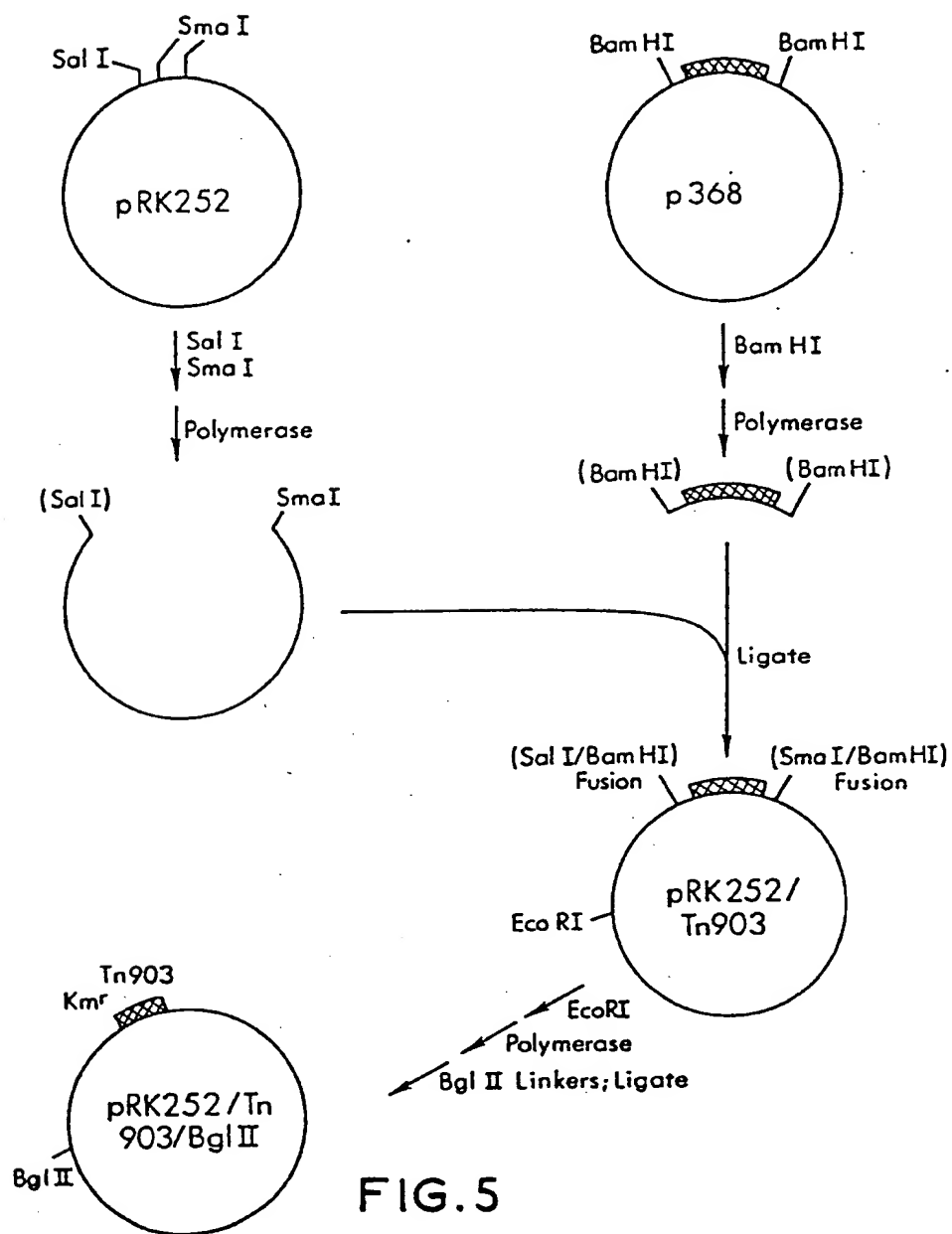


FIG.5



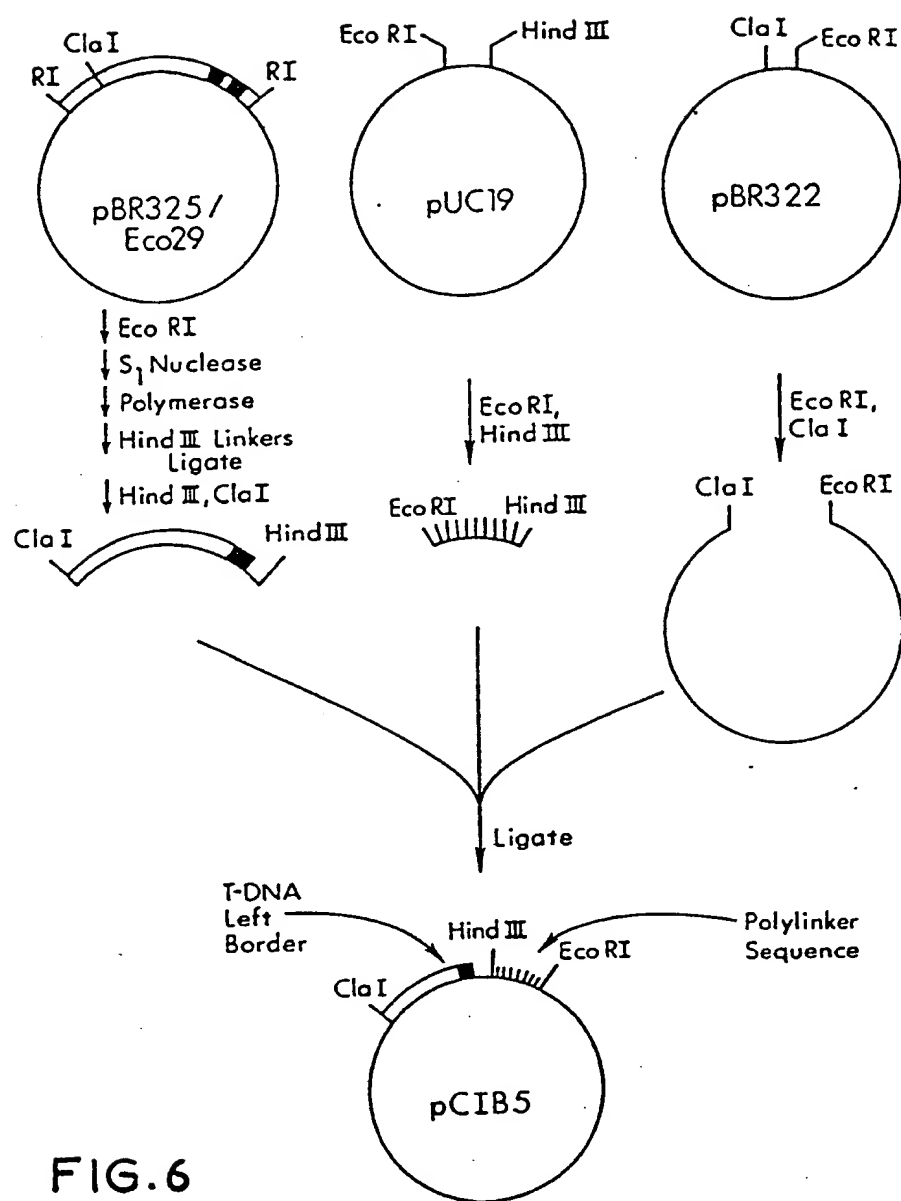


FIG.6

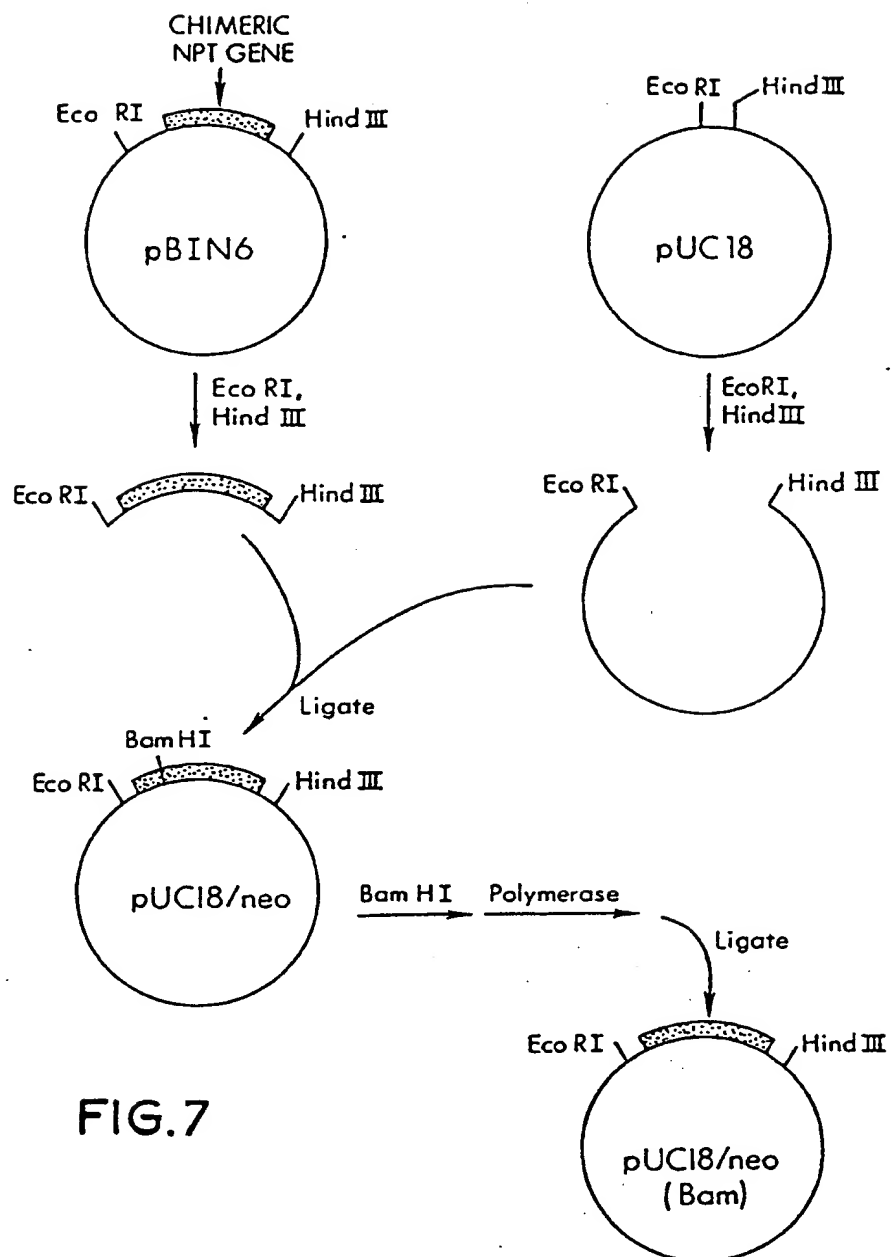


FIG.7

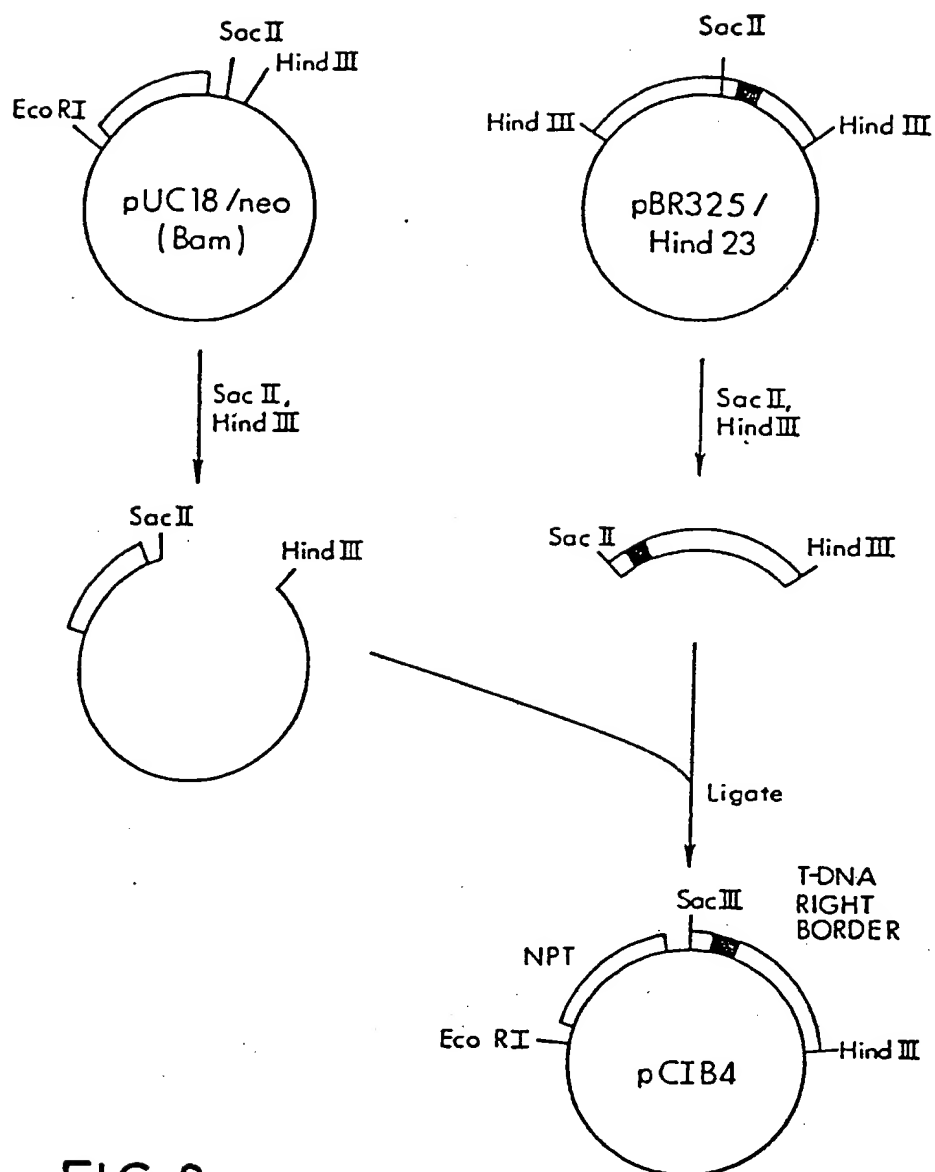


FIG.8

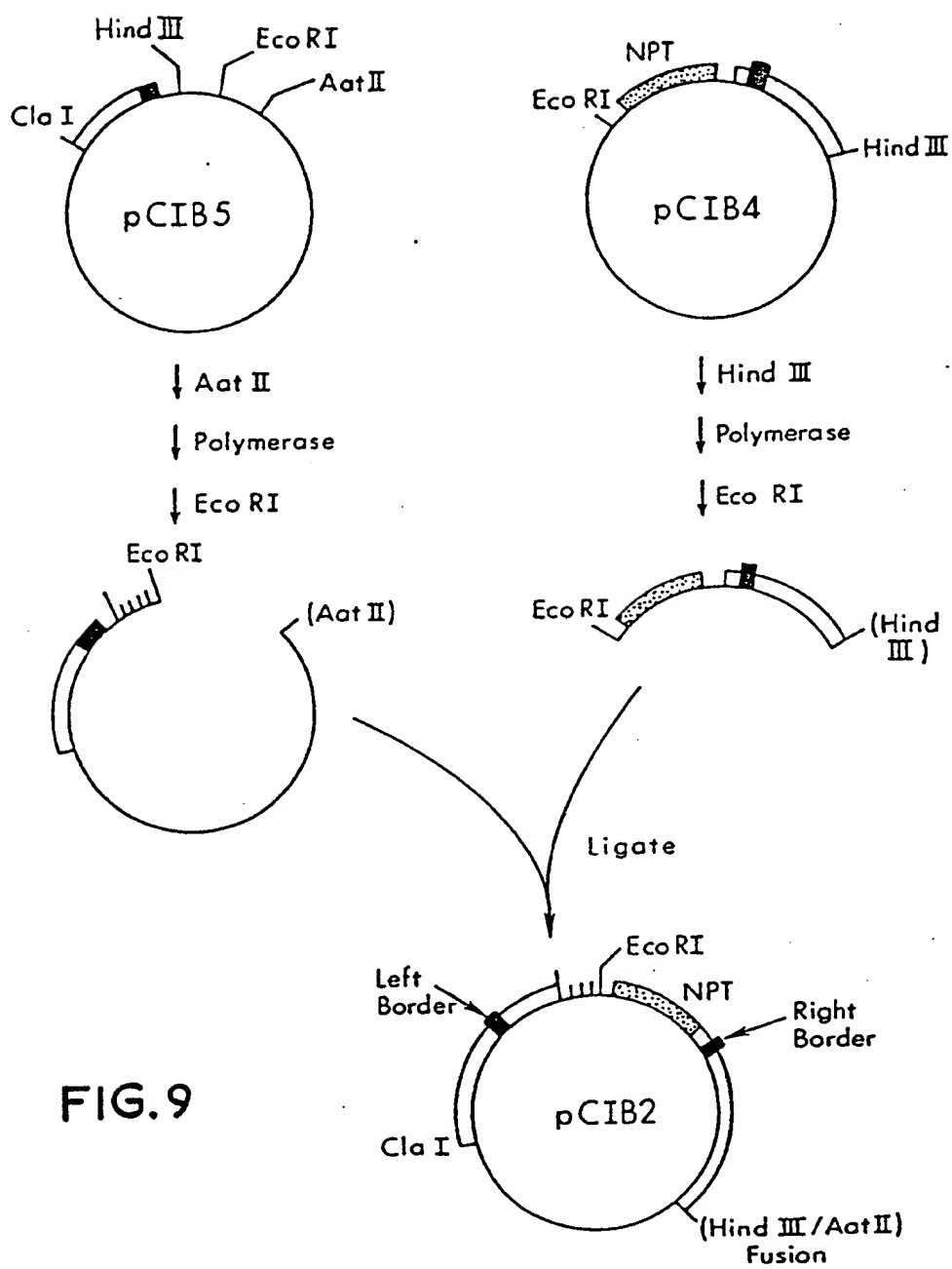


FIG.9

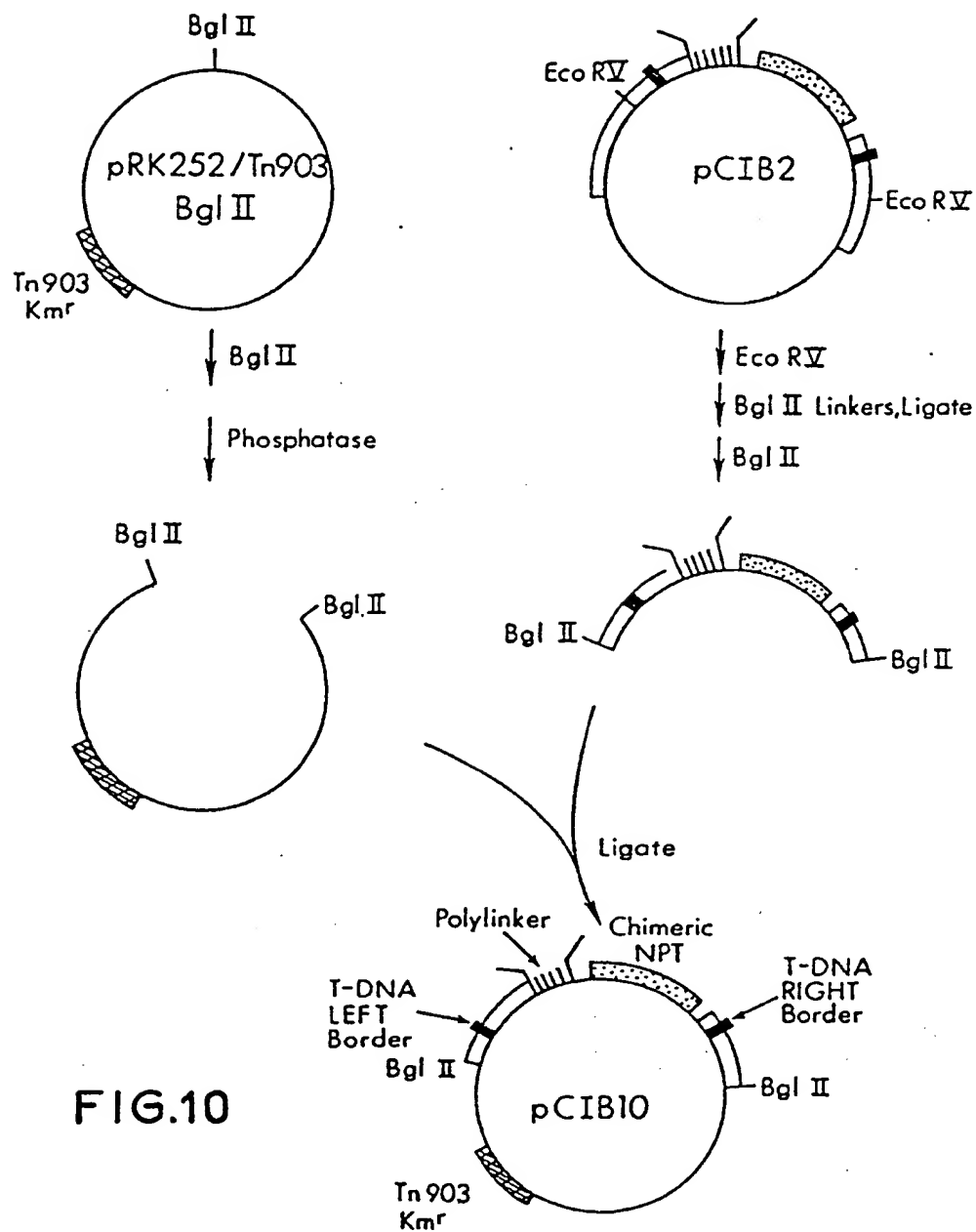


FIG.10

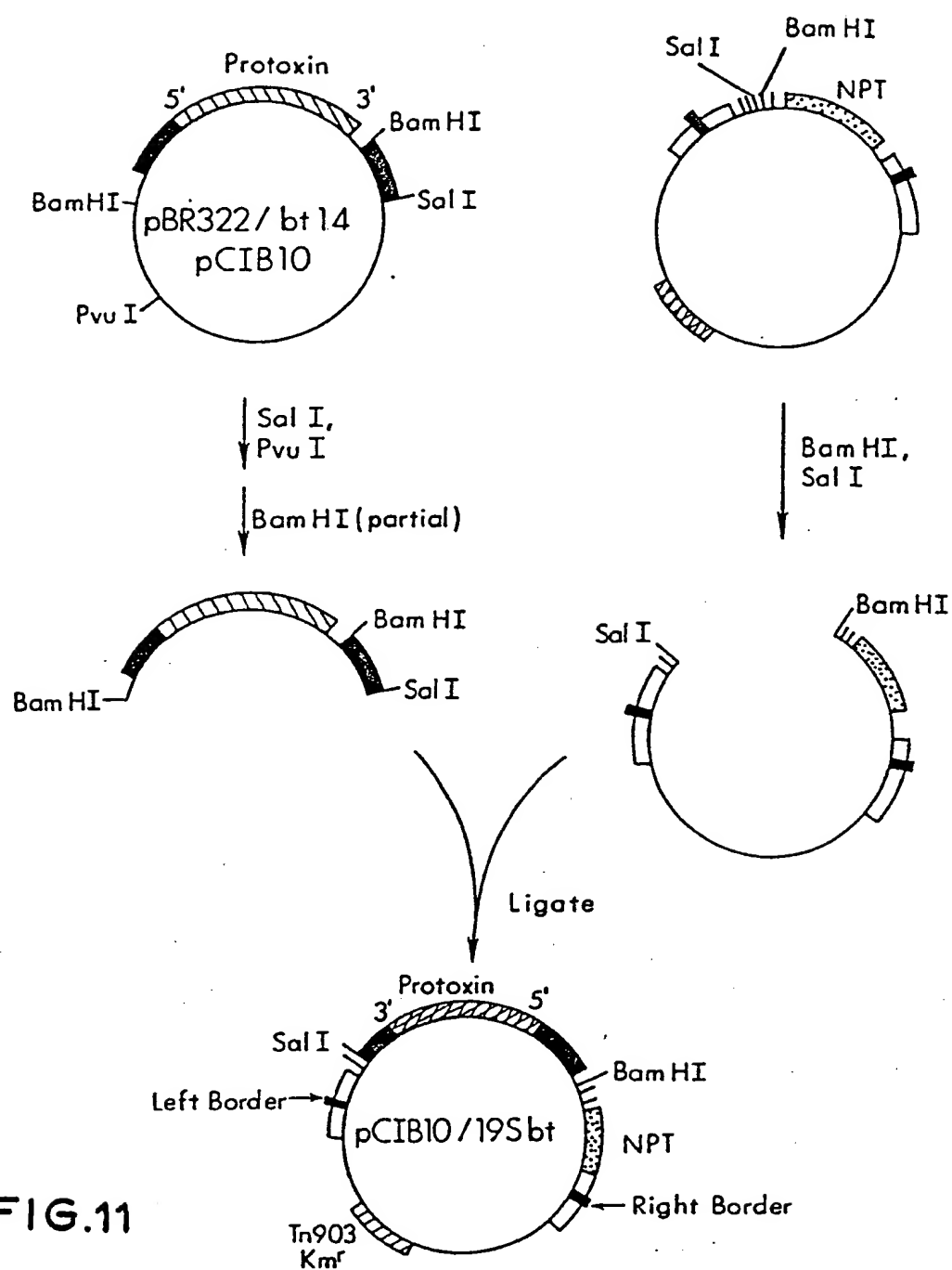


FIG.11

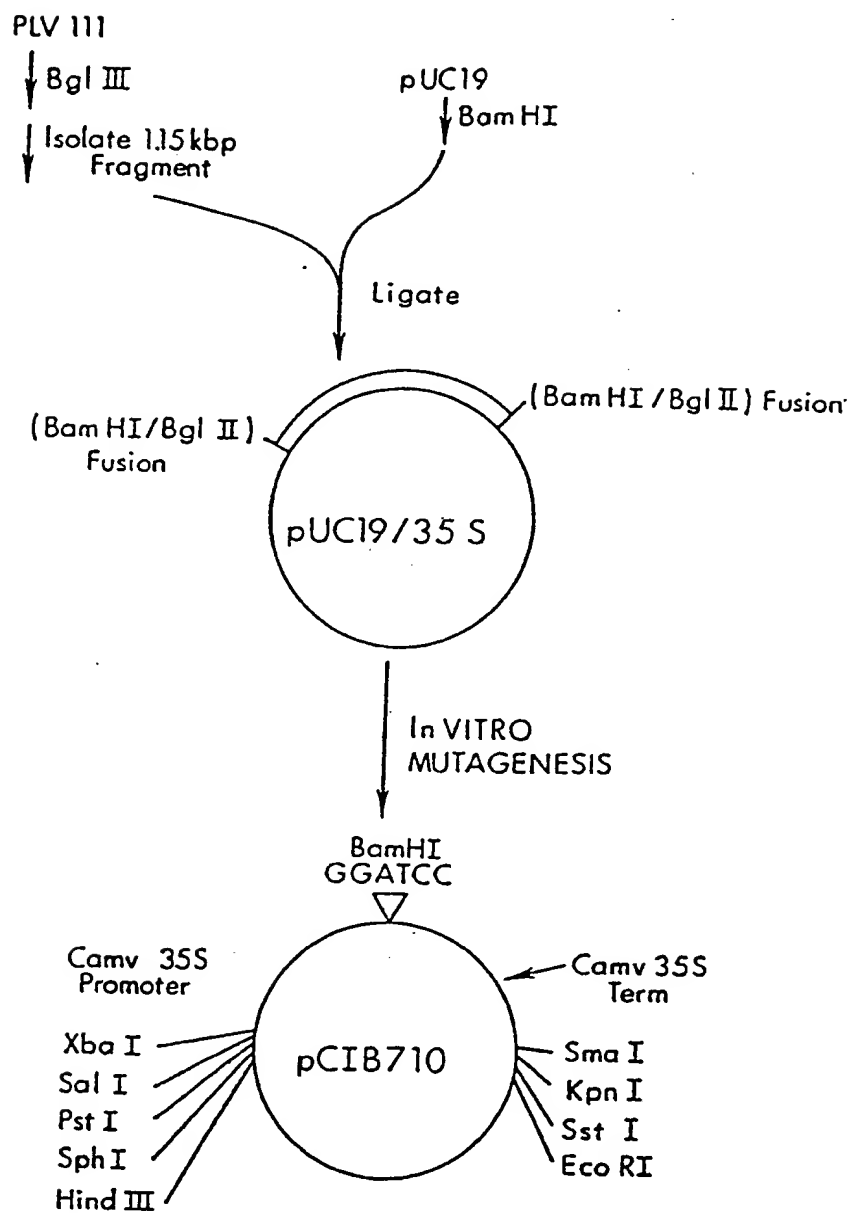


FIG.12

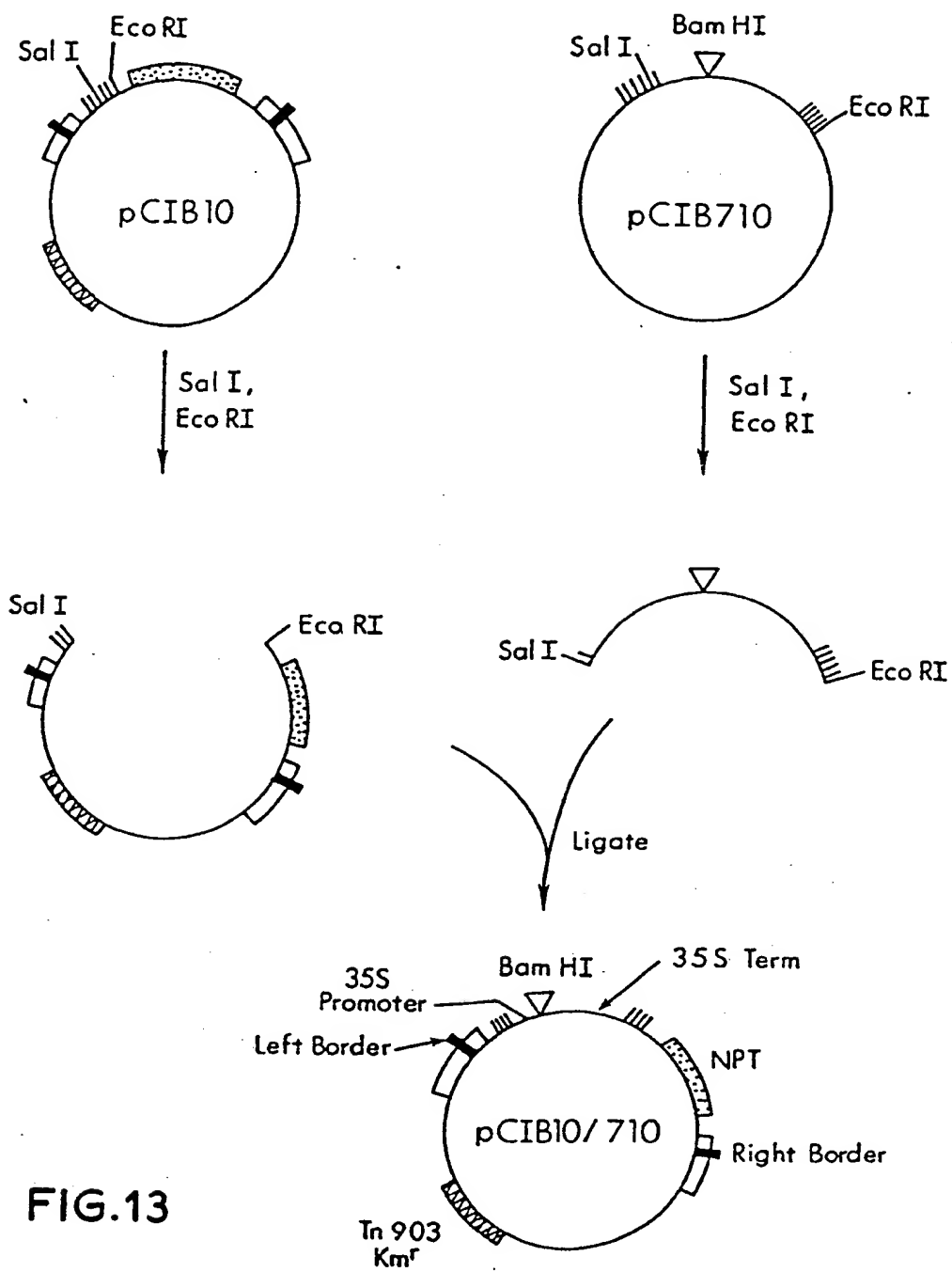


FIG.13



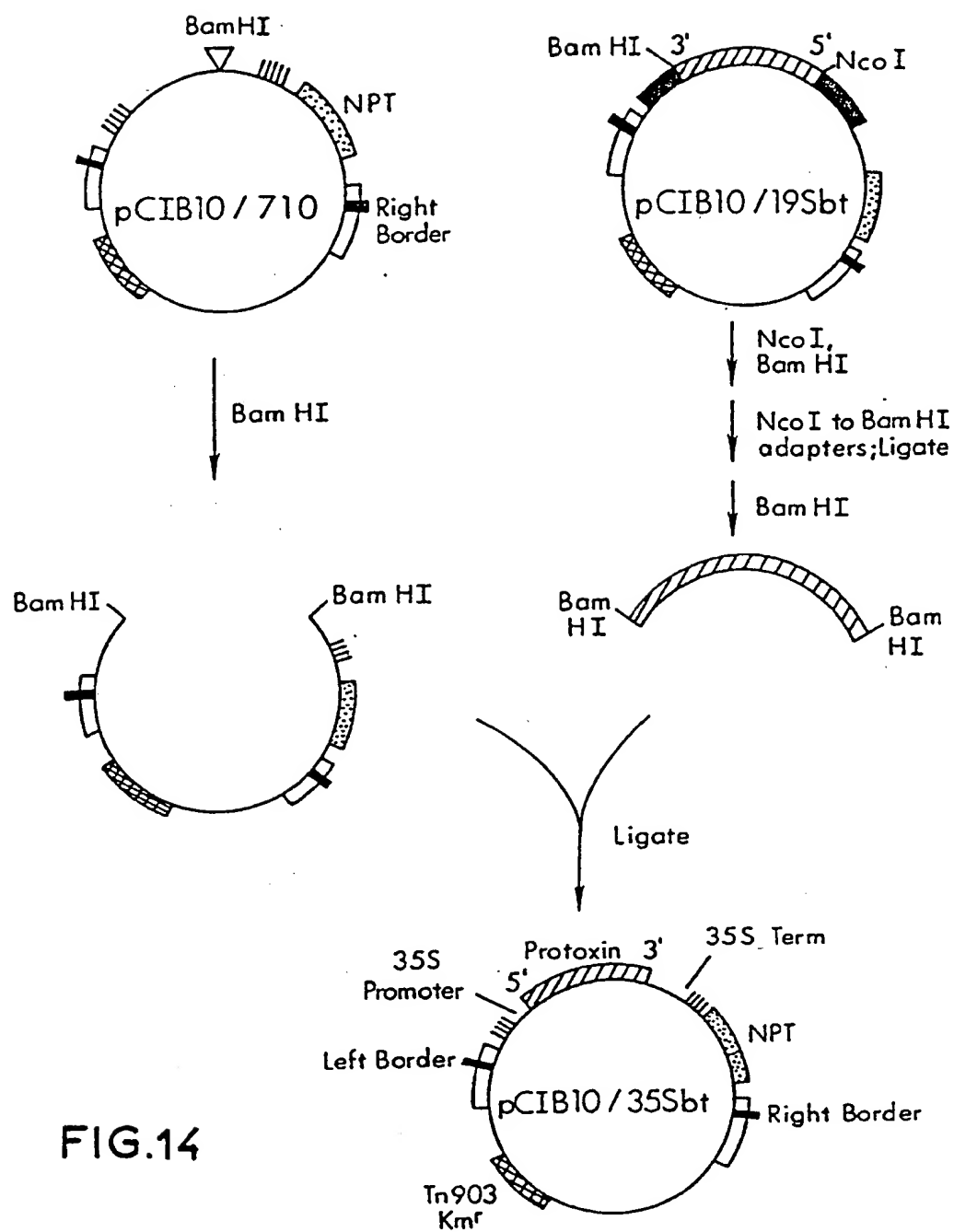


FIG.14

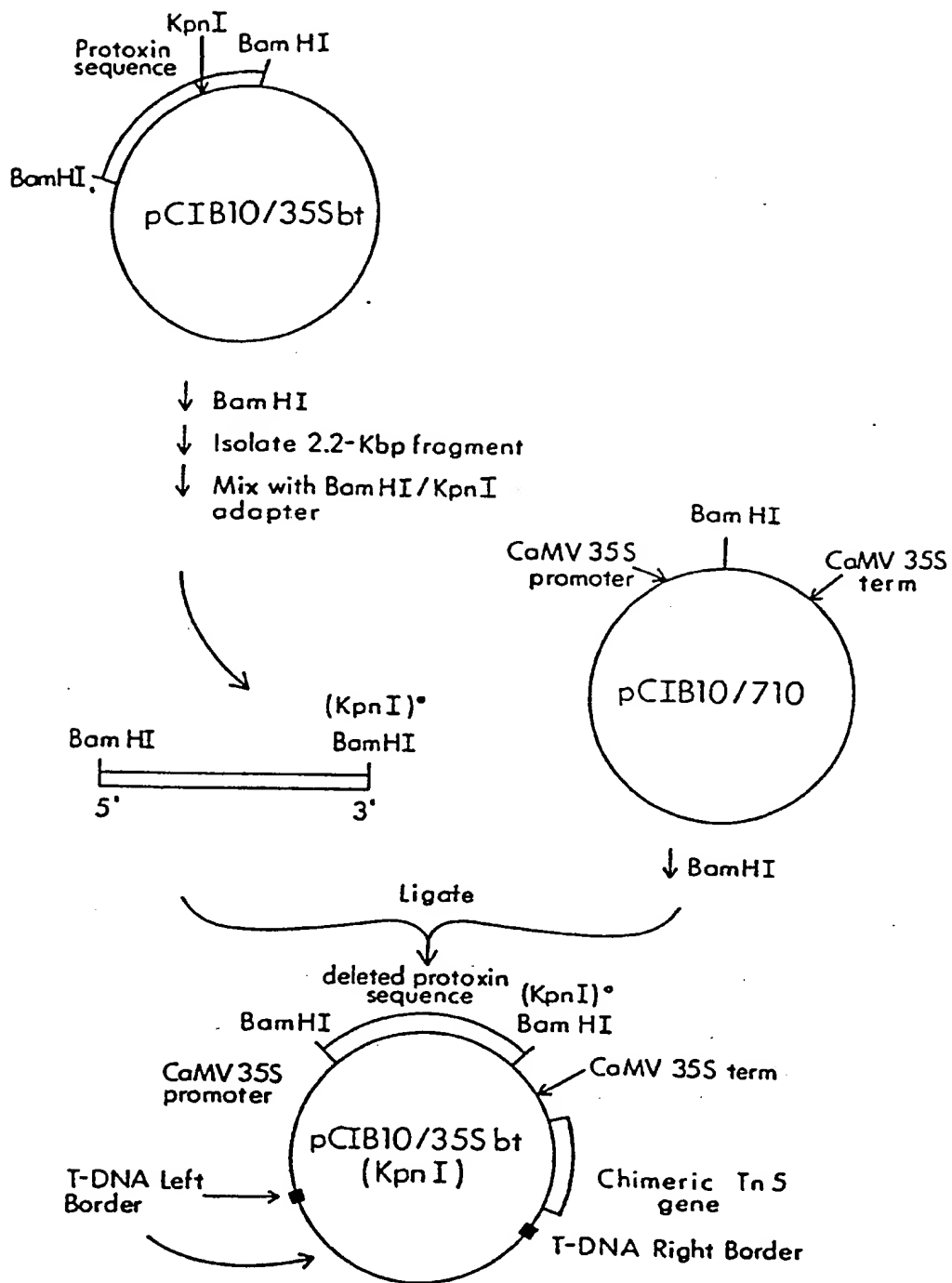


FIG.15

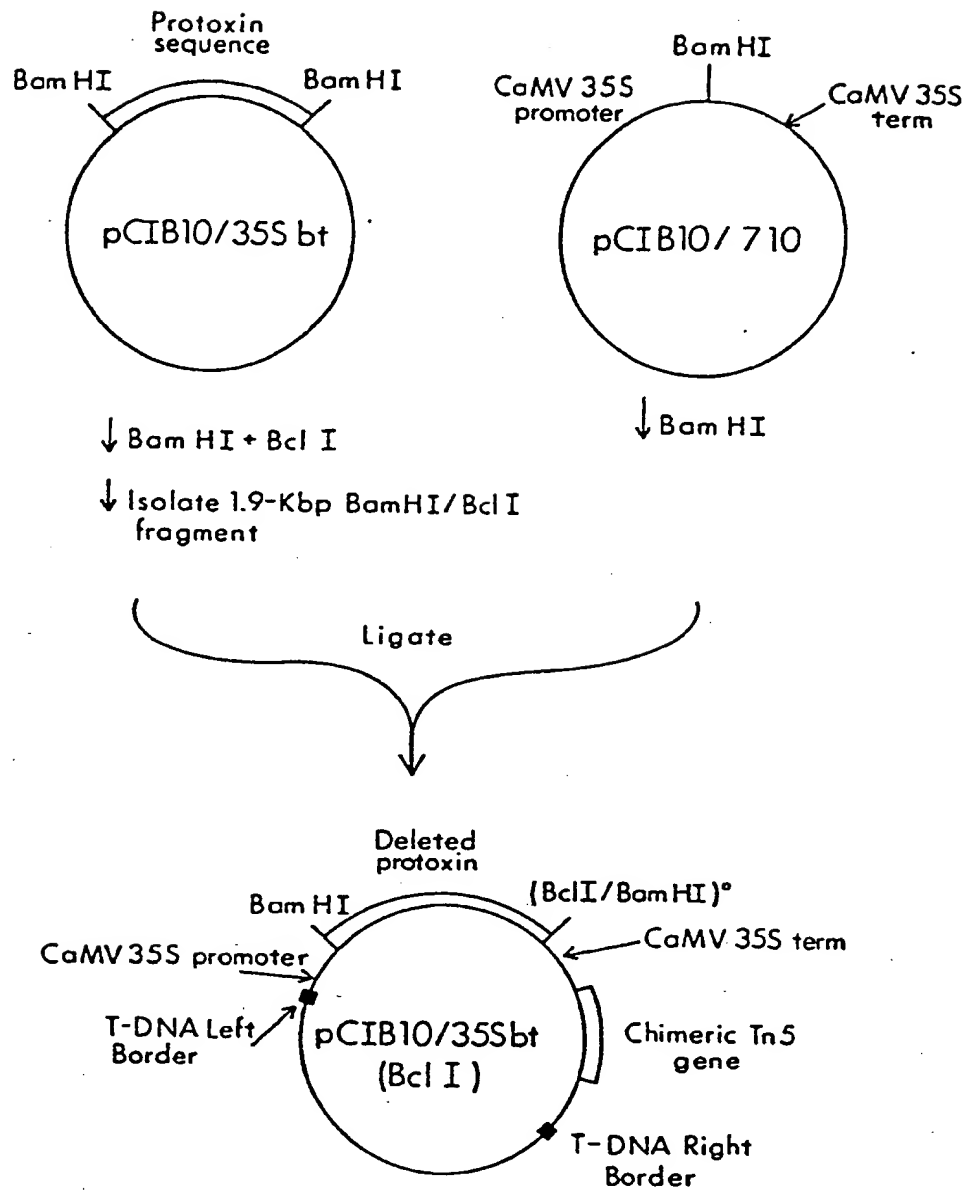


FIG.16

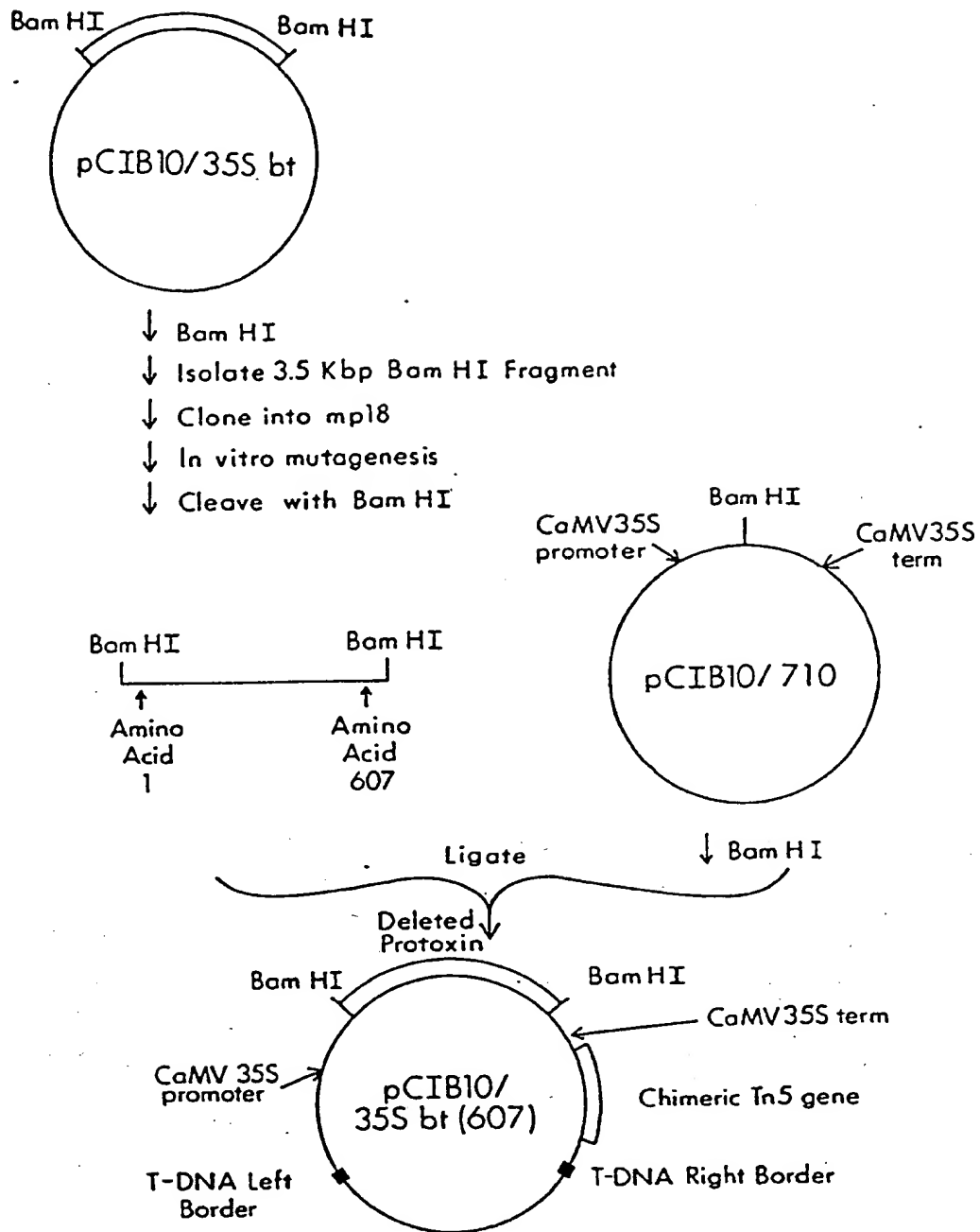
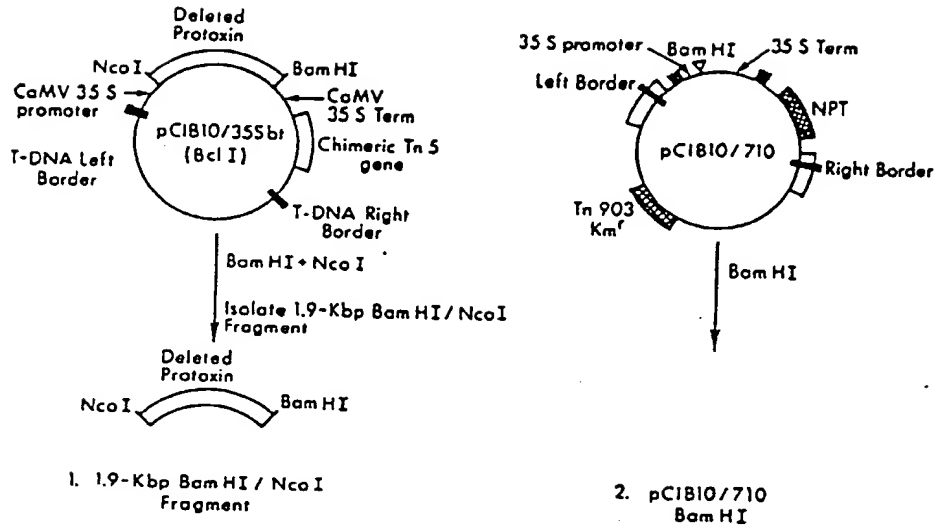


FIG.17



Bam HI GATCCGTTTTTATTTTAAATTTTCTTTCAAATACTTCCAC Nco I  
GCAAAAATAAAAATTAAAAGAAAGTTTATGAAGGTGGTAC

3. Bam HI / Nco I  
5' Untranslated Leader

1. + 2. + 3.

Ligate

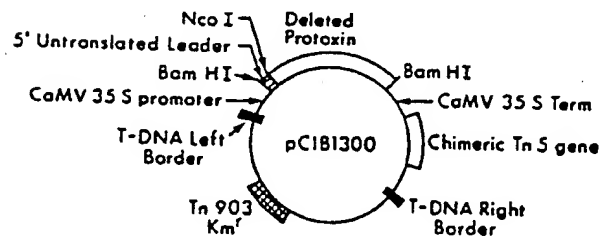


FIG.19

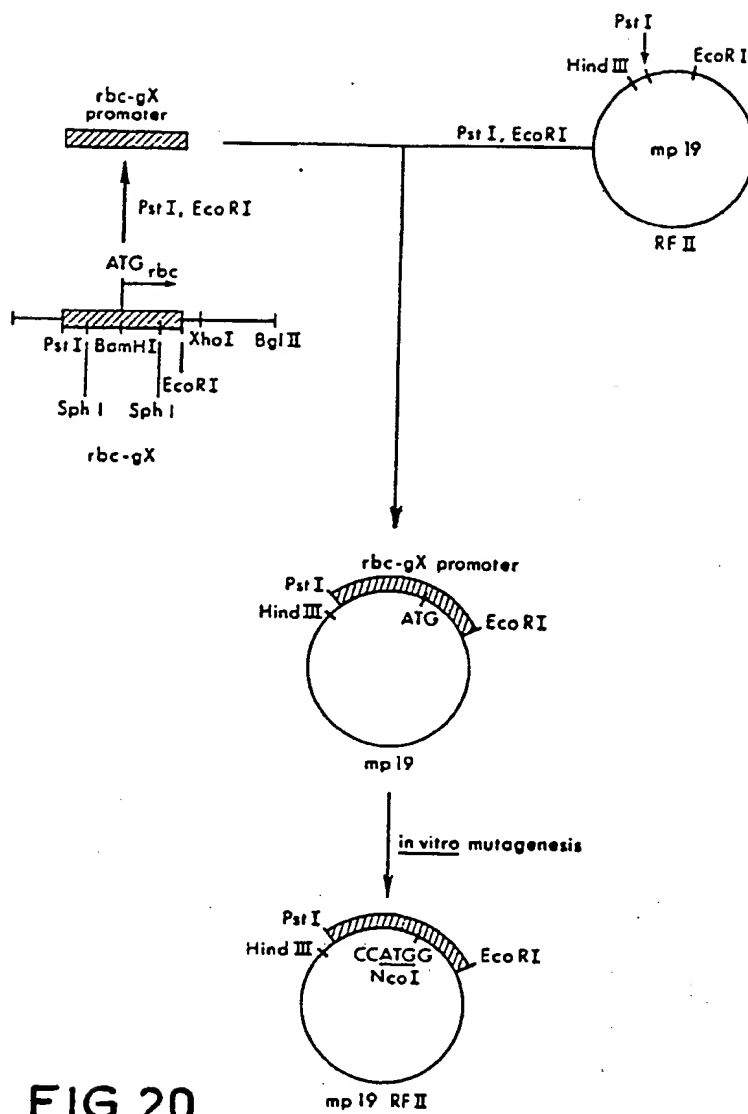


FIG.20

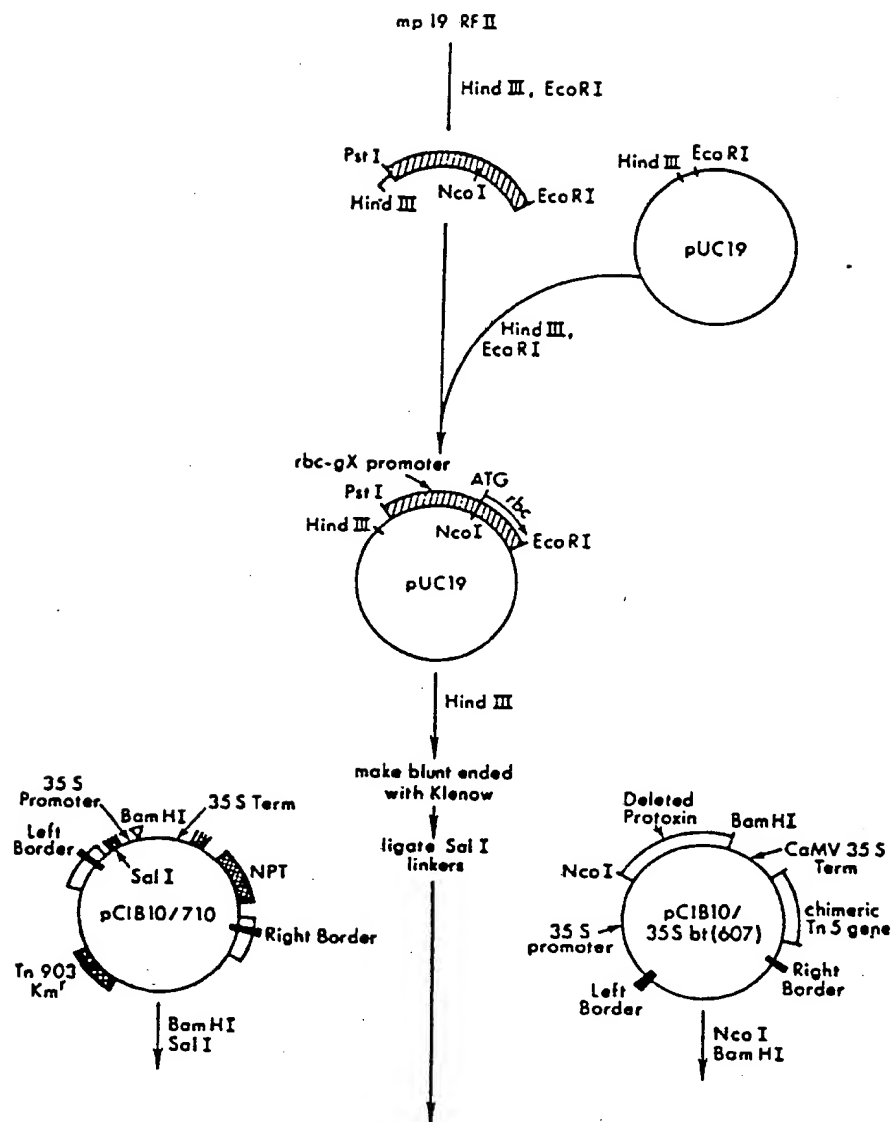


FIG.21

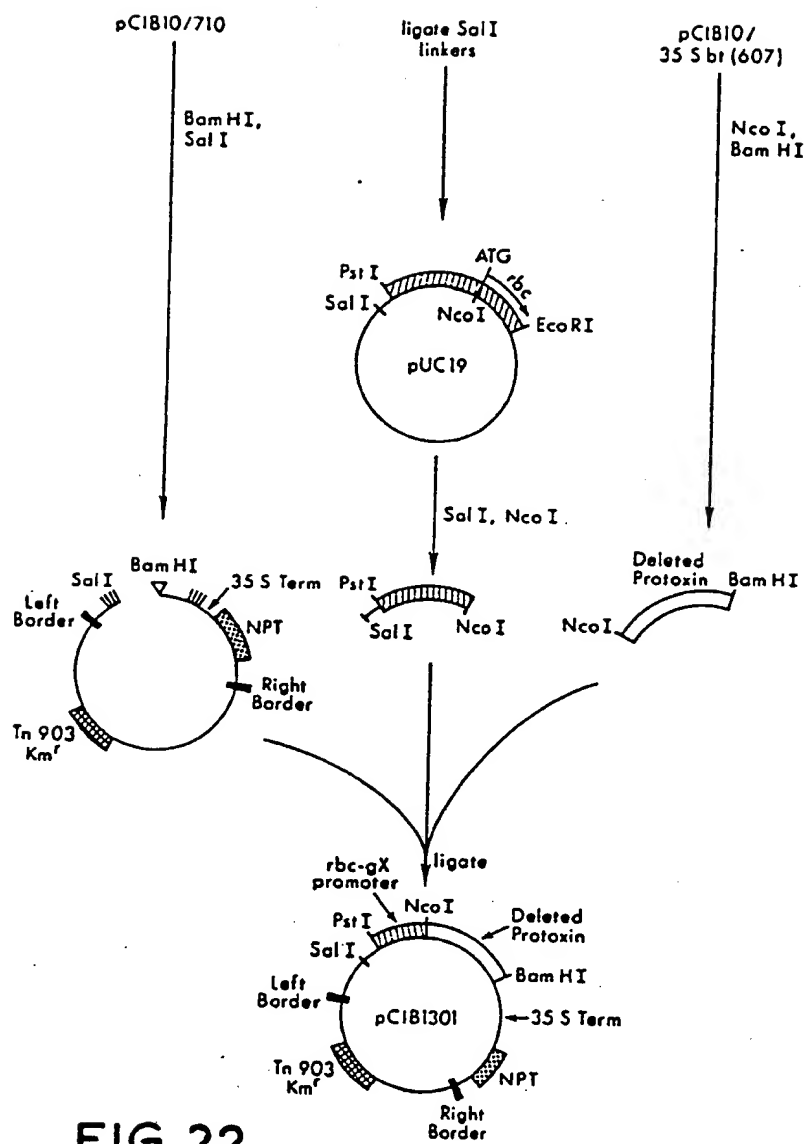


FIG.22



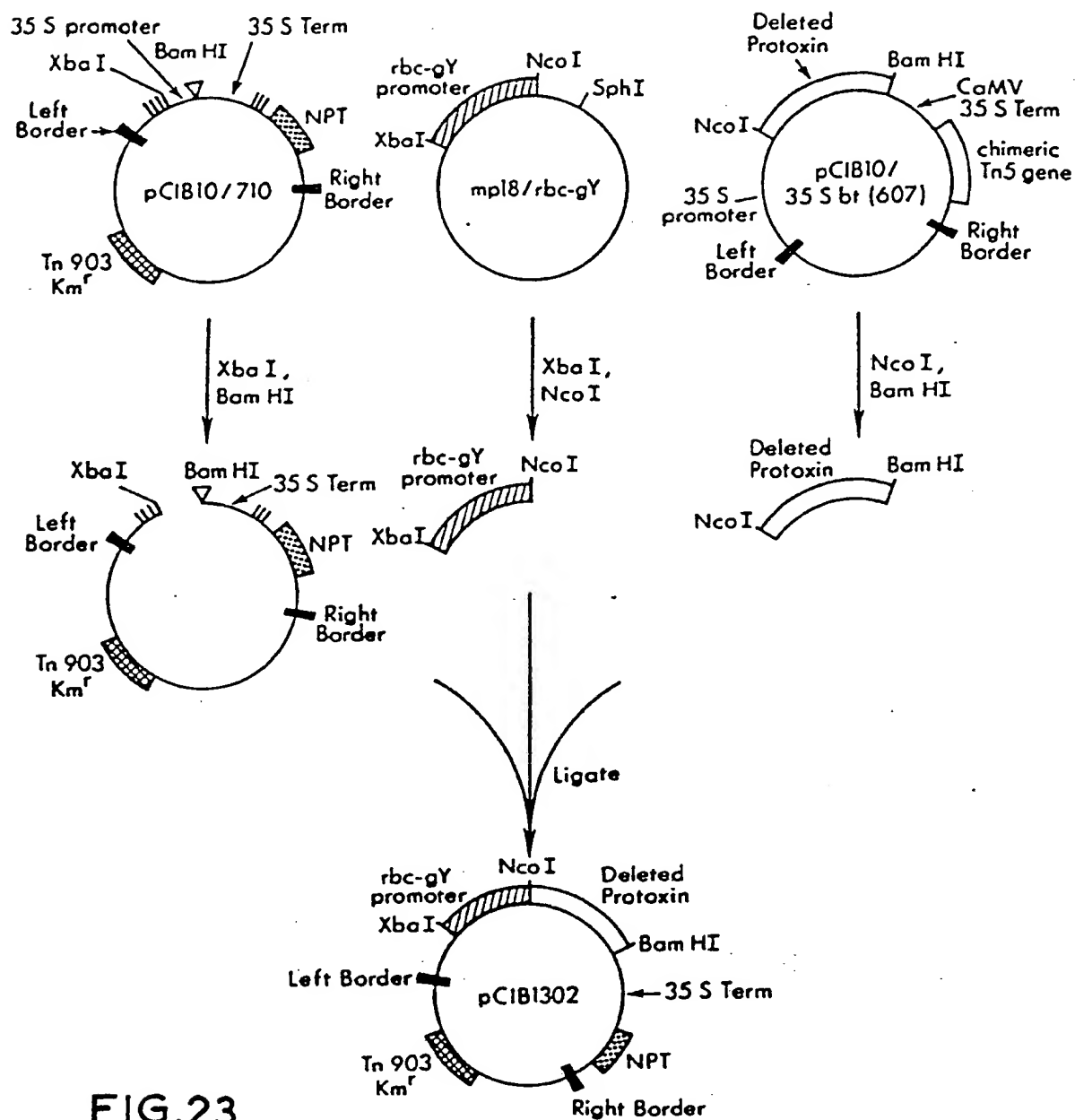


FIG.23

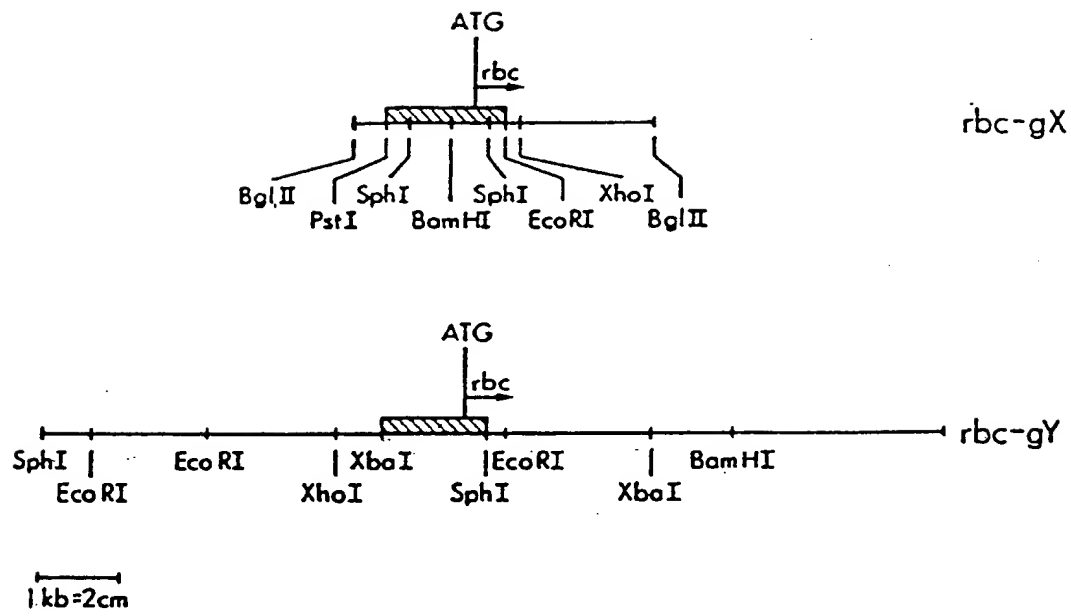


FIG.24

NUCLEOTIDE AND AMINO-ACID SEQUENCES OF RBC-GY  
TRANSIT-PETIDE

```

1  CTACTAGCAATGCTTCCTCAATGATCTCATCGGCTACCATTGCCACTGCCTCTCCGGCA
   +-----+-----+-----+-----+-----+
61  GATGATCGTTACCGAAGGAGTTACTAGAGTAGCCGATGGTAACGGTGACGGAGAGGCCGT
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   L L A M A S S M I S S A T I A T A S P A -
61  CAGGCTAACATGGTCGCTCCTTTACCGGCCTCAAGTCTGCCTCTGCTTTCCCAGTCATC
   +-----+-----+-----+-----+-----+
121 GTCCGATTGTACCAGCGAGGAAAGTGGCCGGAGTTCAGACGGAGACGAAAGGGTCAGTAG
   +-----+-----+-----+-----+-----+
   Q A N M V A P F T G L K S A S A F P V I -
   AGGAAGGCCAACAACGACATTACTTCTCTCGCAAGCAATGGCGGCAGAGTGCAATGC
121 +-----+-----+-----+-----+-----+
   TCCTTCCGGTTGTTGCTGTAATGAAGAGAGCGTTCGTTACCGCCGTCTCACGTTACG
   R K A N N D I T S L A S N G G R V Q C

```

FIG.25

NUCLEOTIDE AND AMINO-ACID SEQUENCES OF RBC-GX  
TRANSIT-PEPTIDE

```

1  AAGCAGTAATAGCAATGGCCTCCTCCATGATCTCATCGGCAACCATTGCCACCGTGAAC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
61  TTCGTCATTATCGTTACCGGAGGAGGTACTAGAGTAGCCGTTGGTAACGGTGGCACTTGA
      A V I A M A S S M I S S A T I A T V N C -
61  GCTCCTCCCCGGCACAGGCCAACATGGTGGCCCCCTTCACCGGCCTCAAGTCTGCCTCTG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
121  CGAGGAGGGGCGTGTCCGTTGTACCACCGGGGAAGTGGCCGGAGTTCAGACGGGAGAC
      S S P A Q A N M V A P F T G L K S A S A -
121  CTTTCCCAGTCACTAGGAAGGCCAACACGACATCACTTCTCTTGCAAGCAATGGTGGGA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
180  GAAAGGGTCAGTGATCCTTCCGTTGTTGCTGTAGTGAAGAGAACGTTTCGTTACCACCT
      F P V T R K A N N D I T S L A S N G G R -
181  GAGTGCAATGC
   -----+-----
CTCACGTTACG
      V Q C

```

FIG.26

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer: **0 317 511 A3**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**(21) Anmeldenummer: **88810767.9**(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12N 5/00, A01H 1/00,  
C12N 15/00, A01N 65/00**(22) Anmeldetag: **09.11.88**(30) Priorität: **18.11.87 US 122109**(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**24.05.89 Patentblatt 89/21**(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**(88) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: **16.10.91 Patentblatt 91/42**(71) Anmelder: **CIBA-GEIGY AG**  
**Klybeckstrasse 141**  
**CH-4002 Basel(CH)**(72) Erfinder: **Rice, Douglas**  
**137 Pinecrest Road**  
**Durham North Carolina 27705(US)**  
Erfinder: **Carozzi, Nadine**  
**Route 6, Box 348P****Raleigh North Carolina 27612(US)**Erfinder: **Lotstein, Richard****1619 Delaware Street****Durham North Carolina 27705(US)**Erfinder: **de Framond, Annick****2422 West Club Blvd.****Durham North Carolina 27705(US)**Erfinder: **Anderson, David M.****1366 E. Skywood Circle****Altadena California 91001(US)**Erfinder: **Rajasekaran, Kanniah****116C Esperanza Avenue****Sierra Madre California 91024(US)**Erfinder: **Rangan, Thirumale S.****2330 E. Del Mar Bl No. 201****Pasadena California 91107(US)**Erfinder: **Yenofsky, Richard****628 W. Norman Avenue****Arcadia California 91006(US)**(54) **Insektizide Baumwollpflanzenzellen.**

(57) Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein chimäres Gen, das in den Zellen von Baumwollpflanzen insektizid wirksame Verbindungen exprimiert, die im wesentlichen die Insekten-toxischen Eigenschaften des von *Bacillus thuringiensis* produzierten kristallinen Proteins besitzen.

Die transformierten Zellen werden zu kompletten Pflanzen regeneriert, die toxisch sind gegenüber Insektenlarven aus den Ordnungen *Lepidoptera*, *Coleoptera* und *Diptera*.

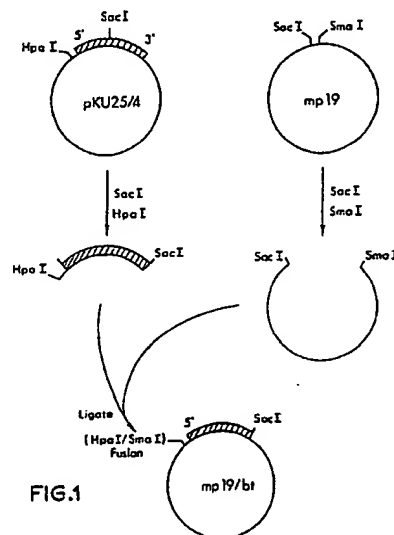


FIG.1

EP 0 317 511 A3



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 88 81 0767

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
Y	BIOTECHNOLOGY, Band 5, Nr. 3, März 1987, Seiten 263-266, New York, NY, US; P. UMBECK et al.: "Genetically transformed cotton (gossypium hirsutum L.) plants" * Insgesamt *	1-43,53 -57	C 12 N 5/00 A 01 H 1/00 C 12 N 15/00 A 01 N 65/00
D,Y	EP-A-0 142 924 (AGRIGENETICS) * Seite 21, Zeile 17 - Seite 22 *	1-37,53 -57	
Y	GENE, Band 53, Nr. 2-3, 1987, Seiten 153-161, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), Amsterdam, NL; S.J. ROTHSTEIN et al.: "Promoter cassettes, antibiotic-resistance genes, and vectors for plant transformation" * Seite 160, linke Spalte *	38-43, 52	
P,X	EP-A-0 289 479 (MONSANTO) * Seite 19, Zeilen 25-57 *	1-5,7-9 ,16-19, 25-29, 34-37, 53-56	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
P,X	EP-A-0 270 355 (AGRACETUS) * Das ganze Dokument, besonders Seite 5, Zeilen 10-16; Ansprüche 10,12 *	1-4,10- 14,16- 18,25- 29,34- 37,53- 56	C 12 N A 01 H A 01 N
A	BIOTECHNOLOGY, Band 5, Nr. 8, August 1987, Seiten 807-813, New York, NY, US; D.A. FISCHHOFF et al.: "Insect tolerant transgenic tomato plants" * Insgesamt *	1,9,14, 20,30, 31,57	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 10-06-1991	Prüfer MADDOX A.D.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	



Europäisches  
Patentamt

## GEBÜHRENPFLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthält bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

- ☐ Alle Anspruchsgebühren wurden innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden.
- nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

x

## MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung; sie enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

1. Patentansprüche 1-37, 53-57: *Bacillus thuringiensis* Kristallprotein Enthaltende Baumwollzellen.
2. Patentansprüche 38-52: Verfahren zur Transformation von Baumwollzellen durch Embryogenese mittels ein Hygromycin-Selektionssystem.

- ☒ Alle weiteren Recherchengebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☐ Nur ein Teil der weiteren Recherchengebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchengebühren entrichtet worden sind.
- nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der weiteren Recherchengebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen.
- nämlich Patentansprüche:



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Seite 2

Nummer der Anmeldung

EP 88 81 0767

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
A	GENE, Band 48, 1986, Seiten 109-118, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division); M. GEISER et al.: "The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of bacillus thuringiensis: nucleotide sequence of the kurhd gene of subsp. kurstaki HD1" * Insgesamt * ---	14,21,22	
A	EP-A-0 193 259 (PLANT GENETIC SYSTEMS) * Seiten 27,31-33; Seite 127, Tabelle 7 * ---	5-15,19	
A	BIOTECHNOLOGY, Band 4, Nr. 4, April 1986, Seiten 305-308, New York, US; C. HERRNSTADT et al.: "A new strain of bacillus thuringiensis with activity against coleopteran insects" * Seite 305, rechte Spalte, "Results"; Seite 308, linke Spalte, Absatz 2 * ---	19	
A	EP-A-0 238 441 (CIBA-GEIGY) ---		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
E	WO-A-8 905 344 (PHYTOGEN) * Beispiele 13,14; Ansprüche 58-79 * -----	1-5,7-9,14,16-37,44,45,49,50-52	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>DEN HAAG</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>10-06-1991</b>	Prüfer <b>MADDOX A.D.</b>
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 150 GLE (P0400)